

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Die Rolle des Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4)
in der Pathogenese eines chronisch-auf-akuten Nierenversagens**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Falk Bernhard Batz

aus Frankfurt am Main

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. rer. biol. hum. Maciej Lech

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann

Prof. Dr. Markus Rehm

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2021

Vorbemerkung

Die vorliegende Arbeit wurde von 2012 bis 2018 am Nephrologischen Zentrum der Medizinischen Poliklinik IV des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die Arbeit wurde betreut von Herrn PD Dr. rer. biol. hum. Maciej Lech. Aus dieser Arbeit ging folgende wissenschaftliche Veröffentlichung hervor: „IFN Regulatory Factor 4 Controls Post-ischemic Inflammation and Prevents Chronic Kidney Disease“, publiziert als Originalartikel in ‚Frontiers Immunology‘ am 01.10.2019, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02162>.

Rechtliche Grundlagen

Bei den in dieser Studie durchgeführten Versuchen wurde darauf geachtet das Leiden der Versuchstiere auf ein Minimum zu reduzieren. Alle mit dieser Dissertation verbundenen Experimente an Tieren waren durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

Förderung des Projekts

Diese Arbeit wurde durch das Graduiertenkolleg 1202 „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (LE2621/6-1) unter Leitung von Prof. Dr. Stefan Endres und der Dr. Werner Jäckstädt-Stiftung gefördert.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, **Falk Bernhard Batz**, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema: „**Die Rolle des Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4) in der Pathogenese eines chronisch-auf-akuten Nierenversagens**“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Folgende Personen haben an der Durchführung dieser Arbeit mitgewirkt:

- PD Dr. rer. biol. hum. Maciej Lech war als Experte die wichtigste Betreuungsperson.
- Janina Mandelbaum und Dan Draganovici, LMU München, fertigten die histologischen Schnitte an und führten die Genotypisierungen der Versuchstiere durch.

München, 29.04.2021

Falk Bernhard Batz

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | Einleitung..... | 11 |
| 1.1 | Das akute Nierenversagen | 11 |
| 1.1.1 | Epidemiologie der akuten Nierenschädigung | 12 |
| 1.1.2 | Ätiologie der akuten Nierenschädigung..... | 13 |
| 1.1.3 | Pathophysiologie der ischämischen Nierenschädigung | 15 |
| 1.2 | Die chronische Niereninsuffizienz..... | 19 |
| 1.2.1 | Definition, Klassifikation, Epidemiologie und Ätiologie der chronischen Niereninsuffizienz..... | 19 |
| 1.3 | Das chronisch-auf-akutes-Nierenversagen | 20 |
| 1.4 | Das Immunsystem | 21 |
| 1.4.1 | Das angeborene Immunsystem | 21 |
| 1.4.2 | Das erworbene Immunsystem..... | 23 |
| 1.4.3 | Interferon-regulierende Faktoren | 25 |
| 1.4.4 | Immunreaktionen durch Ischämie-Reperfusion in der Niere..... | 28 |
| 1.5 | Der Einfluss von IRF4 auf das CAANV | 30 |
| 1.6 | Ziel des Projekts und Hypothese | 35 |
| 2 | Material und Methoden..... | 39 |
| 2.1 | Verwendete Geräte und Materialien | 39 |
| 2.2 | Tierzucht und Tierhaltung | 40 |
| 2.3 | Genotypisierung der Mäuse | 41 |
| 2.4 | Induktion einer transienten renalen Ischämie und Reperfusion | 43 |
| 2.5 | Behandlung der Mäuse mit Clodronat-Liposomen vor Ischämie-Reperfusion | 46 |
| 2.6 | Nierenentnahme nach Ischämie-Reperfusionsoption..... | 47 |
| 2.7 | Blutentnahme und Bestimmung von Kreatinin und Harnstoff im Serum | 47 |
| 2.8 | Gewinnung der RNA und Umschreiben in cDNA | 48 |
| 2.8.1 | Isolierung der RNA aus Nierengewebe | 48 |
| 2.8.2 | RNA-Isolation mittels RNA Mini Kit..... | 49 |
| 2.8.3 | Bestimmung der optischen Dichte und Messung der RNA-Konzentration..... | 50 |
| 2.8.4 | Umschreibung der mRNA in cDNA..... | 51 |
| 2.8.5 | c-DNA Herstellung | 51 |
| 2.8.6 | Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (LightCycler 480)..... | 52 |
| 2.9 | Zellkultur | 57 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 2.9.1 | Isolation von Monozyten aus der Milz | 57 |
| 2.9.2 | Isolation von murinen Tubuluszellen..... | 58 |
| 2.9.3 | Isolierung der CD45+, CD11b+ und CD11c+ Nierenzellen..... | 58 |
| 2.9.4 | Isolierung von BMDMs | 60 |
| 2.9.5 | Stimulation der TECs und CD11b+ Zellen mit LPS | 60 |
| 2.9.6 | Scratch assay | 61 |
| 2.9.7 | In vitro LDH-Zelltodassay | 61 |
| 2.9.8 | Gewebe- und Immunhistochemie | 63 |
| 2.10 | ELISA..... | 66 |
| 2.11 | Western Blot | 66 |
| 2.12 | Durchflusszytometrie | 68 |
| 2.13 | Statistische Auswertung..... | 69 |
| 3 | Ergebnisse..... | 73 |
| 3.1 | IRF4-Expression nach Ischämie-Reperfusion in der Niere..... | 73 |
| 3.1.1 | IRF4-mRNA-Level in der Niere nach renaler IR | 73 |
| 3.2 | Gesteigerte Expression von IRF4 in Immunzellen..... | 74 |
| 3.2.1 | Maximale Expression von IRF4 in Immunzellen nach 24-stündiger LPS-Stimulation | 75 |
| 3.3 | Der Einfluss von IRF4 auf die Makrophagen in der chronischen Phase nach Ischämie-Reperfusion | 76 |
| 3.4 | IRF4 hat keinen Einfluss auf die Regeneration und den Zelltod von tubulären Epithelzellen..... | 80 |
| 3.5 | IRF4 beeinflusst die Entstehung eines CAANV | 85 |
| 3.6 | IRF4 begrenzt die chronische Entzündungsreaktion | 86 |
| 3.7 | IRF4 verhindert die Entstehung atropher Nieren | 87 |
| 3.8 | IRF4 schützt vor dem Tubulusverlust nach akuter Nierenschädigung | 88 |
| 3.9 | IRF4 verhindert die übermäßige Fibrosierung nach akuter Nierenschädigung | 90 |
| 3.10 | IRF4-Defizienz führt zur verstärkten Produktion profibrotischer Marker | 92 |
| 3.11 | IRF4-Defizienz führt zur persistierenden M1-prädominanten Entzündung | 94 |
| 3.12 | Vermehrte Induktion von M1- nicht aber M2-spezifischen Markern in Makrophagen durch IRF4-Defizienz | 96 |
| 4 | Diskussion | 107 |
| 5 | Zusammenfassung | 123 |

| | | |
|----------|------------------------------------|------------|
| 6 | Literaturverzeichnis | 128 |
| 7 | Abkürzungsverzeichnis | 135 |
| 8 | Danksagung | 139 |

Kapitel 1

Einleitung

1 Einleitung

1.1 Das akute Nierenversagen

Lange Zeit herrschte eine breite Uneinigkeit über die Begriffserklärung, Definition und Klassifikation des akuten Nierenversagens (ANV). *Van Biesen* definierte das ANV als kurzfristig eingeschränkte Nierenfunktion mit Anstieg des Serumkreatinins [1]. *Kellum et al.* beschreibt in einer Studie über 35 unterschiedliche Definitionen des ANV [2]. Um Einigkeit in der Begriffserklärung zu schaffen wurde der Terminus „Akutes Nierenversagen“ (ANV oder engl. acute renal failure [ARF]) von der Vereinigung „Acute Kidney Injury Network“ (AKIN) durch den Fachbegriff „Akute Nierenschädigung“ (engl. acute kidney injury [AKI]) ersetzt [3-5]. Die veraltete Bezeichnung „ANV“ setzte die Nierenfunktion zu stark in den Fokus und wird heutzutage vorwiegend zur Beschreibung des totalen Verlustes der Nierenfunktion verwendet. Der Begriff „Akute Nierenschädigung“ hingegen beschreibt die akuten morphologischen und funktionellen Veränderungen der Niere und beinhaltet Charakteristika des akuten Nierenversagens, der akuten Tubulusnekrose (ATN) sowie weiterer Syndrome [3]. Auch minimale Verschlechterungen der Nierenfunktion sind unter dem neuen Terminus gefasst, denn Studien zeigten, dass selbst kleinste Veränderungen der Nierenfunktion die Mortalität erhöhen [6, 7]. Die akute Nierenschädigung ist eine rasch eintretende, potentiell lebensgefährliche Verschlechterung der exkretorischen Nierenfunktion. Diese ist prinzipiell reversibel, wenn eine adäquate Therapie schnellstmöglich begonnen wird [8]. Klinisch maßgebend sind hierbei die Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und des Urinvolumens sowie der Anstieg der Konzentration des Serumkreatinins. Folgen der akuten Nierenschädigung sind die Störung des Flüssigkeits-, Säure-Basen- und Elektrolythaushalts sowie die Retention harnpflichtiger Substanzen [1, 8, 9]. 2002 veröffentlichte die *Acute Dialysis Quality Initiative-Gruppe (ADQI)* die standardisierten RIFLE-Kriterien (engl. risk, injury, failure, loss, end-stage renal disease) [10]. Gemäß dieser Kriterien wird die akute Nierenschädigung nach dem Anstieg des Serumkreatinins, der Menge der Urinausscheidung sowie dem zeitlichen Verlauf eingeteilt. Als überarbeitete und vereinfachte Version der RIFLE-Kriterien definierte das *Acute Kidney Injury Network* 2007 die sog. AKIN-Kriterien [3]. Im Jahre 2012 wurde die aktuellste Klassifikation der akuten Nierenschädigung veröffentlicht. Die akute Nierenschädigung wird hier nunmehr in drei Stadien eingeteilt. Das Stadium 1 besteht bei einer 1,5- bis 1,9-fachen Erhöhung des Ausgangsserumkreatinins, einer

Zunahme des Serumkreatinins um 0,3mg/dl oder einer Urinausscheidung von <0,5ml/kg/h über 6 bis 12 Stunden. Das Stadium 2 ist definiert als Anstieg des Serumkreatinins um das 2,0- bis 2,9-fache des Ausgangswerts oder einer Urinausscheidung <0,5 ml/kg/h über 12 Stunden. Das Stadium 3 besteht ab einer 3-fachen Erhöhung des Ausgangsserumkreatinins, einer Erhöhung des Kreatinins um ≥ 4 mg/dl, bei Dialysepflichtigkeit, bei Oligurie von weniger als 0,3ml/kg/Stunde über mindestens einen Tag oder bei Anurie über ≥ 12 Stunden [11].

Mit diesen vereinheitlichten Richtlinien bietet sich eine praktikierbare Klassifikation für die Anwendung im klinischen Alltag. Auch die internationale Vergleichbarkeit sowie einheitliche Diagnose- und Therapiebasis ist damit sichergestellt. Im Klinikalltag dominiert weiterhin häufig die Differenzierung zwischen prä-, intra- und postrenalem Nierenversagen. Das beruht darauf, dass die AKIN-Kriterien keine Rückschlüsse auf die Ursachen des Nierenversagens geben. Zudem können allgemeine Prognosewerte und Aussagen hinsichtlich Mortalität können nicht abgeschätzt werden.

1.1.1 Epidemiologie der akuten Nierenschädigung

Die Vergleichbarkeit epidemiologischer Studien zur akuten Nierenschädigung ist angesichts der beschriebenen uneinheitlichen Begriffserklärungen und Klassifikationen stark beeinträchtigt. Vor allem einheitliche Inzidenzen lassen sich anhand der epidemiologischen Studien kaum definieren. Die Inzidenzraten variieren zwischen 1 % und 31 % und die Mortalitätsraten liegen zwischen 15 bis 60 % [1, 12]. Meist entwickelt sich die akute Nierenschädigung in medizinischen Einrichtungen und hier v. a. auf Intensivstationen. Bis zu 7 % der stationären Patienten, ca. ein Drittel der Intensivpatienten und mehr als die Hälfte der beatmeten Patienten erleiden eine akute Nierenschädigung [13, 14]. In den letzten Jahren wird eine Inzidenzzunahme sowie eine Zunahme der Morbidität und Mortalität nach akuter Nierenschädigung beobachtet. Einige Autoren sprechen von einer Verdoppelung bis Vervierfachung der Inzidenz und von einer Versechsfachung der stationären Aufnahmen aufgrund von akuter Nierenschädigung [15, 16]. Andere Wissenschaftler beschreiben, dass die tatsächliche Inzidenzentwicklung maßgeblich unterschätzt wird [7, 17]. Auch die Datenlage zur Mortalität variiert. So geben Studien Mortalitätsraten von 15 bis 60 % an, bei Intensivpatienten sogar von 50 bis 70 % [14, 18]. Zusätzlich erhöhen Begleit- und Grunderkrankungen die Mortalität [19]. Einige Studien konnten zeigen, dass die Schwere der akuten Nierenschädigung selbst ein Prädiktor für die Mortalität bei schweren Grunderkrankungen

darstellt [20]. So ist die akute Nierenschädigung bspw. ein signifikanter und unabhängiger Prädiktor für die Mortalität von postoperativen kardiothorakalen Patienten [21], postapoplektischen Patienten [22] oder HIV-infizierten Patienten [23]. Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor ist der Zeitpunkt der Diagnosestellung. Die frühzeitige Therapie weist eine Mortalität von 47 % auf. Ein verzögerter Therapiebeginn hingegen, erhöht die Mortalität auf 67 % [24]. Die beobachtete Inzidenz- und Mortalitätszunahme ist der heutigen höheren Lebenserwartung mit einer schnell wachsenden Population der über 60-Jährigen, geschuldet. So kommt es zu einer Inzidenzzunahme von 1,9 % bei unter 60-Jährigen auf 2,6 % bei Menschen die mindestens das 85. Lebensjahr erreicht haben [7]. Ursächlich für die Inzidenzzunahme im höheren Alter sind altersbedingte Veränderungen der Niere, Multimorbidität sowie die damit verbundene erhöhte Medikamenteneinnahme. Neben dem Alter sind Vorerkrankungen, männliches Geschlecht und ethnischem Hintergrund weitere Risikofaktoren der akuten Nierenschädigung [25]. Insgesamt hat die seltenere ambulant erworbene akute Nierenschädigung ein besseres Gesamtüberleben als die im Krankenhaus erworbene akute Nierenschädigung [26]. Eine behandlungspflichtige Grunderkrankung ist folglich ein bedeutender Prädiktor. Neben der Nierenersatztherapie stellen v. a. die Komplikationen der akuten Nierenschädigung, die Komorbiditäten und die lange Krankenhausaufenthaltsdauer eine hohe finanzielle Belastung für das Gesundheitssystem dar [19, 27].

1.1.2 Ätiologie der akuten Nierenschädigung

In der Theorie wird die akute Nierenschädigung v. a. ätiologisch, entsprechend der pathophysiologischen Ursache, eingeteilt. Man differenziert hierbei zwischen prärenalen, intrarenalen und postrenalen Formen der akuten Nierenschädigung. Meist lässt sich keine einzelne Noxe definieren, sodass die Übergänge zwischen den einzelnen Formen fließend sind oder es liegen mehrere Ursachen gleichzeitig vor. Die akute Nierenschädigung bei Sepsis hat bei bspw. eine ischämische, eine infektiologische sowie eine toxische Komponente. Die prärenale Läsion ist die häufigste Ursache mit ca. 55 bis 60 %, gefolgt von der intrarenalen Läsion mit rund 35 bis 40 % und zuletzt dem postrenalen Nierenversagen mit ungefähr 5 % aller Fälle [9, 13].

Das prärenale Nierenversagen ist die physiologische Reaktion auf Ischämie, der akuten arteriellen Minderversorgung der Nieren. Bei milder bis mäßiger arterieller Minderperfusion und schneller Wiederherstellung der Blutversorgung ist das prärenale akute Nierenversagen, ohne primären

renalen Parenchymschaden, unmittelbar reversibel. Kommt es jedoch nicht zur zeitnahen und ausreichenden Reperfusion, so resultiert die totale Ischämie. Es folgt ein nahtloser Übergang vom prärenalen zum intrarenalen ANV. Im Gegensatz zum prärenalen ANV sind beim intrarenalen ANV auch morphologische Korrelate der akuten renalen Schädigung zu finden [13]. Vor allem die Gewebhypoxie und die unzureichende Versorgung mit Metaboliten und Oxidationsmitteln bestimmen hierbei die veränderte Histologie. Um eine konstante gleichmäßige Perfusion zu gewährleisten, hat die Niere die Fähigkeit autoregulatorisch auf Schwankungen des mittleren arteriellen Blutdruckes zu reagieren und damit den Gefäßwiderstand der afferenten und efferenten Arteriolen fast annähernd konstant zu halten. So können Werte des mittleren arteriellen Blutdrucks zwischen 80mmHg und 200mmHg toleriert und abgefangen werden [4, 28]. Grundsätzlich kann zwischen der systemischen Hypovolämie und der gestörten renalen Hämodynamik als Ursachen renaler Hypoperfusion unterschieden werden. Die systemische Hypovolämie ist bedingt durch einen erhöhten Flüssigkeitsverlust bzw. einer ungenügenden Flüssigkeitszufuhr und führt zu einer renalen Schocksymptomatik. Die Steigerung der renalen Ausscheidung bei Diabetes insipidus oder bei Diuretikaeneinnahme kann aufgrund von Exsikkose zu renaler Minderperfusion führen. Auch extreme Diarrhö und vermehrtes Erbrechen sowie innere und äußere Blutungen bei schweren Verletzungen oder Verbrennungen können ursächlich für das prärenale Nierenversagen sein. Die gestörte renale Hämodynamik stellt den zweiten Mechanismus der Minderversorgung der Nieren dar. Trotz ausreichendem Blutvolumen kommt es hierbei zum prärenalen Nierenversagen. Die systemische Vasodilatation bei Sepsis oder Kreislaufchock unterschiedlicher Genese sowie der Abfall des Herzzeitvolumens und des arteriellen Mitteldrucks bei kardiovaskulären Erkrankungen können in renaler Minderperfusion resultieren. Auch das hepatorenale Syndrom oder eine renale Vasokonstriktion führen zur akuten prärenalen Nierenschädigung. Eine weitere Ursache des prärenalen Nierenversagens stellt die Verlegung der Arteria renalis dar. Hier seien Niereninfarkte, z. B. bei Aortendissektion und die iatrogene Ischämie bei Nierentransplantationen genannt. Kommt es zu keiner ausreichenden Wiederherstellung der Blutversorgung der Niere oder dauert die renale Ischämie zu lange an, entwickelt sich aus dem prärenalen Nierenversagen das intrarenale Nierenversagen. Die Ursache des intrarenalen Nierenversagens steht im direkten Zusammenhang mit dem Nephron und ist ischämischen oder toxischen Ursprungs. Man differenziert zwischen primären Schädigungen des makrovaskulären oder mikrovaskulären Gefäßsystems, primären Tubulusschäden und Schädigungen des Niereninterstitiums.

Das postrenale akute Nierenversagen entsteht durch eine mechanische Obstruktion der ableitenden Harnwege. Der Harnabfluss wird dabei durch intra- bzw. extraluminale Abflussbehinderungen

gestört. Es kommt zum Rückstau des Urins und zur Dilatation der Ureteren, der Nierenbecken und des Nierenkelchsystems. Mit steigendem Gegendruck im Tubulussystem nimmt die GFR ab und es kommt zu Nephronschädigungen. Ursachen können angeborene Missbildungen und erworbene Abflusshindernisse im Bereich der Nieren, der Harnleiter, der Blase oder der Urethra sein. Eine Hauptlokalisation der Verengungen der ableitenden Harnwege ist der Bereich zwischen äußerem Urethrasphinkter und Blasen Hals. Hier kommt es bspw. bei Prostatapathologien oder Erkrankungen des retroperitonealen Raumes zum Rückstau des Urins. Auch Medikamente, wie Neuroleptika und Anticholinergika, können bei vorbestehender Abflussbehinderung eine sog. Harnsperrung und damit ein akutes postrenales Nierenversagen induzieren. Je länger die Abflussbehinderung besteht, desto schwerwiegender ist die renale Schädigung [9].

1.1.3 Pathophysiologie der ischämischen Nierenschädigung

Bei der durch Ischämie-Reperfusion (IR) verursachten Nierenschädigung kommt es zu einer Minderversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie einer mangelnden Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten. Dies resultiert in einer Schädigung der Tubuluszellen. Aufgrund von Hypoxie nach IR folgen irreversible Schäden an renalen Tubuluszellen im S3-Segment der Nephrone und eine überschießende angeborene Immunantwort, die sog. Nekroinflammation [29]. Die Folge ist eine Nierenfunktionsstörung mit Akkumulation von harnpflichtigen Substanzen und Veränderungen des Wasser- und Elektrolythaushalts des Körpers. Die Niere wird mit rund 20 bis 25 % des Herzminutenvolumens durchblutet. Dies verdeutlicht den enormen Sauerstoffbedarf und erklärt warum die Niere sehr empfindlich auf ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffversorgung und Sauerstoffverbrauch reagiert [30]. Durch Reduktion von Sauerstoff wird Energie generiert, die v. a. für die Aktivität der Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase (Na^+/K^+ -ATPase) des Tubulusepithels benötigt wird und den Transport von Ionen über Ionenpumpen sicherstellt. Der proximale Tubulus und hier v. a. das sensible S3-Segment sowie Anteile der dicken aufsteigenden Henle-Schleife haben den höchsten Sauerstoff- und Energiebedarf und tragen den größten Schaden bei Hypoxie [13]. Die Architektur der Nephrone und der kleinsten Gefäße dient der Sicherstellung der Sauerstoffversorgung sowie der Aufrechterhaltung des osmotischen Gradienten der Vasa recta des Nierenmarks, der zur Konzentrierung des Urins notwendig ist [31]. Die ischämische akute Nierenschädigung gliedert sich pathophysiologisch in drei aufeinanderfolgende Phasen: Die Initialphase, die Erhaltungsphase und die Regenerationsphase.

Die Initialphase ist durch rechtzeitige und ausreichende Reperfusion reversibel und dauert wenige Stunden bis Tage [13]. Durch die Schädigung des Nierenparenchyms kommt es in dieser Phase zu einer Reduktion der GFR, des Filtrationsdrucks und der Nierenperfusion. Aufgrund des Blutmangels bei der ischämischen Nierenschädigung ist der Perfusionsdruck gesenkt und bedingt die unzureichende glomeruläre Ultrafiltration bzw. die verminderte GFR. Durch morphologische und biochemische Veränderungen bei Hypoxie kommt es zunächst zum Ungleichgewicht vasoaktiver Faktoren, die eine Vasokonstriktion hervorrufen [32]. Bis zu einem renalen Perfusionsdruck von 80mmHg können autoregulatorische Mechanismen der Niere die physiologische GFR aufrechterhalten. Bei Unterschreiten dieser Grenze kommt es jedoch zum reduzierten Perfusionsdruck und zur insuffizienten Durchblutung der postglomerulären und peritubulären Gefäße. Die tubulären Epithelzellen (TECs) tragen keinen unmittelbaren Schaden. Falls die Minderperfusion jedoch anhält, kommt es zur akuten Tubulusnekrose. Histopathologisch findet man zum einen nekrotische sowie apoptotische Zellen und zum anderen gesunde oder beschädigte Zellen, die potentiell reparabel sind [32]. Der Zelldetritus, aus zu Grunde gegangenen Zellen, hebt sich von der Basalmembran ab. Er gelangt in das tubuläre Lumen, verschließt dieses und führt letztlich zur Erhöhung des intraluminalen Drucks. Es entstehen sog. gipsartige Formationen, die das Lumen der Tubuli vollständig obstruieren [32]. Zusätzlich kommt es durch das zunehmend zerstörte Tubulusepithel zur unkontrollierten transtubulären Absorption von Primärfiltrat in das Interstitium, welches sich ödematös verändert. Auch Tubulusepithelzellen schwellen nach Hypoxie an. Dies komprimiert die peritubulären Gefäße zusätzlich und bedingt die verstärkte Hypoperfusion [33]. Aufgrund des Sauerstoff- und Nährstoffmangels bei Ischämie kommt es rasch zur Minderversorgung der Zellen mit Energieträgern, wie Adenosintriphosphat (ATP). Energieabhängige Transportvorgänge kommen schließlich zum Erliegen. Des Weiteren kommt es zum Polaritätsverlust der Zellen und im weiteren Verlauf zum Zerfall des Zytoskelettes. Die spezifische Polarität der Tubuluszellen wird durch spezielle interzelluläre Adhäsionsmoleküle, den *tight junctions*, aufgebaut. Sie verbinden benachbarte Zellen und bilden so eine interzelluläre Barriere. Bei ischämischer Schädigung geht diese physiologische Barrierefunktion verloren und apikal gelegene Strukturen, wie der Bürstensaum und wichtige Membranproteine, dislozieren [32]. Die basolateral gelegene Na^+/K^+ -ATPase, mit der Funktion des Aufbaus eines intrazellulären Natriumgradienten zur Natrium- und Wasserrückresorption, wandert auf die luminal Seite des Tubulus. Mit dem Verlust der Polarität steigt folglich die intraluminale Natriumkonzentration. Die Macula densa registriert den Anstieg der Natriumkonzentration und bedingt über eine tubuloglomeruläre Rückkopplung die Vasokonstriktion der afferenten Gefäße [34, 35].

Es entsteht ein Circulus vitiosus, ein schädlicher Kreislauf, bei dem die Blutversorgung der Niere immer weiter abnimmt. Neben den oben erwähnten gipsartigen Formationen, die sich aus Zelldetritus entwickeln, entstehen durch die unphysiologisch hohe intratubuläre Natriumkonzentration sog. Tamm-Horsfall-Proteine. Diese Proteine werden in den Zellen des dicken aufsteigenden Teils der Henle'schen Schleife synthetisiert, proteolytisch gespalten und in das Tubulolumen abgegeben. Aufgrund der erhöhten luminalen Natriumkonzentration bei Verlust der Zellpolarität, fällt das Tamm-Horsfall-Protein intraluminal galertartig aus [36, 37]. Es wird angenommen, dass das Tamm-Horsfall-Protein durch Aktivierung von Immunzellen immunmodulatorische Funktionen besitzt [38]. Der hypoxiebedingte Schaden wird durch vermehrte Aktivität von Phospholipasen und Proteasen bei Energiemangel verstärkt. Dabei kommt es v. a. bei Reperfusion des zuvor ischämisch gestörten Gewebes zu oxidativem Stress. Auch die Endothelzellen peritubulärer Gefäße werden durch den oxidativen Stress angegriffen. Zusammen mit dem Überwiegen vasokonstriktorischer Botenstoffe, wie dem Endothelin, bedingt der oxidative Stress eine Gefäßverengung mit weiterer Minderversorgung des nachfolgenden Gewebes und die Expression von Adhäsionsmolekülen für Leukozyten [32]. Die lädierten Tubulusepithelien sezernieren lokale Zyto- und Chemokine, welche die schädigende Aktivität der Leukozyten steigern [4]. Endoplasmatische Enzyme wie die Cyclooxygenase, Xanthinoxidase und leukozytäre Enzyme der infiltrierenden Neutrophilen Granulozyten bilden bei Ischämie-Reperfusion vermehrt schädigende Sauerstoffradikale (engl. *reactive oxygen species*, ROS), die einen zusätzlichen destruierenden Effekt haben [33, 39]. Im Rahmen der Ischämie und aufgrund des ATP-Mangels kommt es zusätzlich zum frühzeitigen Kalziumanstieg im Zytosol, welches durch Vasokonstriktion und Aktivierung von Proteasen sowie Phospholipasen wiederum die Blutversorgung behindert und das Zytoskelett zerstört. Bisher ist nicht eindeutig geklärt, wie groß der Einfluss des Kalzium-Anstiegs auf die tubuläre Schädigung ist [12]. Des Weiteren führt die Ischämie zum Ungleichgewicht von Purinen. Zum einen werden durch den Mangel an ATP vermehrt Purine verbraucht, zum anderen bewirken einige Purine die arterielle Vasokonstriktion und die Synthese von ROS [33]. Zudem schädigen Phospholipasen, v. a. die Phospholipase A₂, das Tubulusepithel. Durch Hydrolyse von Phospholipiden werden schädigende anionische Fettsäuren freigesetzt. Daneben erhöht die aktivierte Phospholipase die Permeabilität von Zellmembran und Mitochondrienmembran, was den intrazellulären Energiehaushalt beeinflusst. Zusätzlich aktiviert die Ischämie-Reperfusion die Peroxidation von Membranlipiden. Durch das Mehrangebot von Substraten synthetisiert die Phospholipase große Mengen an Arachidonsäure,

die zu Eicosanoiden verstoffwechselt wird. Diese wiederum führen zur Vasokonstriktion, zur Chemotaxis von Leukozyten und zu einer allgemeinen Entzündungsreaktion [9, 13, 33, 35].

Auf die Initiation folgt die Erhaltungsphase, die Phase der anhaltenden Ischämie. In dieser ca. ein- bis zweiwöchigen Phase kommt es zu einem weiteren Zellzerfall und Entzündungsprozesse werden angestoßen. Die GFR sinkt weiter ab und stabilisiert sich, trotz Normalisierung des Blutdrucks, auf ihrem Minimalwert. Klinisch zeigen sich in dieser Phase der Stabilisierung urämische Komplikationen und die Urinausscheidung befindet sich auf dem Tiefstand. Pathophysiologisch könnte ein Ungleichgewicht der Sezernierung von vasokonstriktorisches Faktoren aus beschädigten Zellen des Endothels und inflammatorischen Mediatoren aus renalen Parenchym- und Immunzellen für die fortwährende Ischämie und die Persistenz der niedrigen GFR verantwortlich sein [35].

Zuletzt tritt die Regenerations- oder Erholungsphase ein, die bis zu mehrere Wochen andauern kann. Die Niere regeneriert, es bildet sich ein neues Tubulusepithel, der Bürstensaum und das Zytoskelett proliferieren wieder und die Zellpolarität wird wiederhergestellt. Die GFR steigt langsam wieder an und normalisiert sich idealerweise. Die sensiblen Tubuli und Sammelrohre regenerieren verzögert, sodass es durch mangelnde Rückresorption von Wasser und Elektrolyten zur Polyurie kommen kann [13, 33].

1.2 Die chronische Niereninsuffizienz

1.2.1 Definition, Klassifikation, Epidemiologie und Ätiologie der chronischen Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz (CNI) ist definiert als Abweichung der normalen Nierenstruktur oder der Nierenfunktion über mehr als drei Monate mit negativen Auswirkungen auf den Gesundheitszustand. Es sollte mindestens ein Marker für die Nierenschädigung vorliegen: Albuminurie (Ausscheidung von Albumin $\geq 30\text{mg}$ pro Tag, Urinalbumin-Kreatinin-Quotient $\geq 30\text{mg/g}$), eine histologisch oder mittels Bildgebung diagnostizierte pathologische Nierenmorphologie, eine vorangegangene Nierentransplantation, Störungen des Elektrolythaushalts, strukturelle Veränderungen durch Funktionsstörungen der Tubuli oder ein auffälliges Urinsediment. Im klinischen Alltag wird die CNI anhand der GFR eingeteilt. Die 2002 von der Organisation „*National Kidney Foundation*“ veröffentlichte Klassifikation „*kidney disease outcomes quality initiative*“ wurde im Jahre 2012 durch die Vereinigung „*kidney disease: improving global outcomes*“ (KDIGO) aktualisiert. Die erneuerte Richtlinie umfasst die Angaben der Grunderkrankung, die Albuminausscheidung sowie die glomeruläre Filtrationsrate (CGA-Klassifikation). Die Ausscheidung von Albumin wird in drei Kategorien eingeteilt: A1 $<30\text{ mg}$ pro Tag, A2 $30\text{-}300\text{ mg}$ pro Tag und A3 $>300\text{ mg}$ pro Tag. Die GFR wird in sechs Unterkategorien untergliedert. Die KDIGO-Klassifikation der Kategorie 3 wird weiter in 3a (GFR $45\text{-}59\text{ ml/Minute/1,73m}^2$) und 3b (GFR $30\text{-}44\text{ ml/Minute/1,73m}^2$) eingeteilt [40].

Aktuell leben in Deutschland circa 70.000 dialysepflichtige Patienten. Die Inzidenz und Prävalenz des Chronischen Nierenversagens (CNV) sind steigend. Das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse ist bei Patienten mit CNV erhöht und die Mortalitätsrate bei dialysepflichtigen Patienten liegt bei bis zu 20 % [41]. Neben den Beeinträchtigungen für die erkrankten Patienten, stellt die CNI eine enorme gesellschaftliche Belastung dar: Die Behandlungskosten belaufen sich auf ungefähr drei Milliarden Euro pro Jahr. Die Kosten bei Dialysepflichtigkeit liegen pro Patient bei circa 40.000 Euro pro Jahr [42]. Auch international ist die CNI ein wachsendes Problem. Es leiden aktuell ca. 13 % der Weltbevölkerung an einer CNI. Ätiologisch ist die diabetische Nephropathie mit 35 % die häufigste Ursache der CNI. Daneben sind Glomerulonephritiden (ca. 15 %), polyzystische Nierenerkrankungen (ca. 10 %), vaskulär hypertensive Nierenerkrankungen und chronisch tubulointerstitielle Nephropathien weitere Ursachen für eine chronische Nierenschädigung.

1.3 Das chronisch-auf-akutes-Nierenversagen

Das Krankheitsbild des chronisch-auf-akutes-Nierenversagens (CAANV) wurde 1967 zum ersten Mal von *Briggs et al.* beschrieben und ist definiert als langsam verlaufender, progredienter Verlust der Nierenfunktion nach akuter Nierenschädigung [43]. Zahlreiche Studien konnten belegen, dass die akute Nierenschädigung als wichtiger Risikofaktor für die Progression zum CAANV angesehen werden muss. *Bagshaw* zeigt in Untersuchungen zum langfristigen Verlauf nach ANV, dass 5 bis 20 % der Patienten mit überlebtem ANV ein CAANV entwickeln [44]. Studien von *Lo* beschreiben ein 28-fach erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines CNV nach ANV und eine Verdopplung der Gesamtmortalität nach ANV [45]. *Amdur* beschreibt, dass 20 % der Patienten mit akuter Tubulusnekrose innerhalb von vier Monaten ein CNV entwickeln [46]. Die renale Prognose nach ANV und die Risikofaktoren für die Entwicklung des CAANV sind noch nicht ausreichend untersucht. Bekannt ist jedoch, dass die Verschlechterung der Nierenfunktion nach akuter Nierenschädigung durch den Allgemeinzustand des Patienten und die ursprüngliche Nierenfunktion bestimmt wird. Eine vorbestehende Niereninsuffizienz, gemessen am Ausgangsserumkreatinin, bestimmte genetische Faktoren, Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus, Arteriosklerose oder Hypertension und ein höheres Patientenalter sind prognostisch ungünstige Einflussfaktoren [18, 47, 48]. Auch hier erschwert die geringe Sensitivität der klinischen Nierenfunktionsparameter im *nahe-der-Norm* Bereich die Beurteilung der Risikofaktoren. Im hohen Lebensalter nimmt z. B. die Muskelmasse und damit auch die endogene Kreatinin-Produktion ab. Durch diese altersphysiologische Abnahme des Kreatininwertes können parallele Nierenfunktionsverluste unerkannt bleiben und normal erscheinende Kreatininwerte fehlinterpretiert werden [49].

Der genaue Pathomechanismus des CAANV bleibt bislang ungeklärt. Eine wichtige Komponente in der Pathogenese des CAANV scheint jedoch das Immunsystem zu sein. Denn nach ischämischem ANV hat die begleitende Entzündungsreaktion bedeutenden Einfluss auf das Ausmaß der Nierenschädigung. *Bonventre* bezeichnet das ANV sogar als entzündliche Erkrankung [50]. Vor allem die Zellregeneration wird maßgeblich durch die begleitende Immunreaktion beeinflusst. Durch fehlerhafte Reparaturprozesse hat das Immunsystem einen entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der Nierenschädigung nach ANV und die Entstehung des CAANV [51].

1.4 Das Immunsystem

Als System der inneren und äußeren Abwehr garantiert das Immunsystem die körperliche Unversehrtheit. Dabei unterscheidet das Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen. Die Immunantwort ist ein komplexes Zusammenspiel aus humoralen und zellulären Vorgängen, aus welchen sich Definitionen und Klassifikationen für die einzelnen Komponenten und Abläufe des Immunsystems ergeben. Die Zusammenarbeit des angeborenen, unspezifischen Immunsystems mit dem erworbenen, spezifischen oder auch adaptiven Immunsystem garantiert die erfolgreiche Immunabwehr.

Das Immunsystem wird vielseitig reguliert und kontrolliert. Kommt es zu einer Fehlregulation bzw. einer unkontrollierten Aktivierung der Immunantwort, kann das Immunsystem erhebliche Schäden am Organismus anrichten. Genetisch bedingte Immundefekte und autoimmunologische Reaktionen, mit überschießender Immunreaktion gegen körpereigenes Gewebe, führen zu Entzündungsreaktionen und Gewebeschäden. Systemisch-entzündliche Kollagenosen, wie die Sklerodermie [52] oder der Systemische Lupus erythematodes [53], als Erkrankungen aus dem „rheumatischen Formenkreis“, zeigen wie verheerend das Ausmaß von Fehlregulationen des Immunsystems sein kann. Beispiele für Regulationsmechanismen des Immunsystems sind blockierende Adaptermoleküle, wie *TRAM* oder *SARM*, Degradationsenzyme, wie Ubiquitinligasen, negative Regulatoren wie IRF4 sowie Zytokine und Chemokine.

1.4.1 Das angeborene Immunsystem

Die angeborene oder unspezifische Immunantwort ist von Geburt an vorhanden und stellt das frühe und unspezifische Abwehrsystem bei Erstkontakt mit einem potentiellen Krankheitserreger dar. Die Reaktion des Immunsystems wird hierbei als unspezifisch beschrieben, weil sie sich gegen jegliche Fremdkörper richtet, welche Krankheitserreger, Mikroorganismen, andere Fremdschubstanzen und körpereigene Strukturen sind. Erreger werden zeitlich unmittelbar, ohne Induktion, abgewehrt. Das Zusammenwirken von Zellen und Mediatoren bedingt eine lokale Inflammation mit den klassischen Kardinalsymptomen einer Entzündungsreaktion. Durch Vasodilatation und vermehrten Blutzufuß kommt es zur Rötung (*rubor*) und Überwärmung (*calor*). Die erhöhte Gefäßpermeabilität führt zu ödematösen Veränderungen (*tumor*). Die

Diapedese und das Schmerzempfinden (*dolor*) sind gesteigert und die Funktion des Gewebes ist gestört (*functio laesa*) [54].

Das angeborene Immunsystem bildet sich aus mechanischen Barrieren, spezifischen Zellen und Botenstoffen. Epithelien der Körperoberflächen bilden mit physikalischen und chemischen Faktoren die erste Barriere der unspezifischen Immunabwehr. Zelluläre Bestandteile, wie Gewebsmakrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und neutrophile Granulozyten, bilden die nächste Stufe der Erregerabwehr. Verlassen Monozyten den Blutkreislauf und migrieren in das Gewebe, so spricht man von Gewebsmakrophagen. Sie phagozytieren Pathogene, sezernieren chemotaktischen Zytokine sowie hochreaktive Sauerstoffmetaboliten (ROS) und entfachen so die weitere Entzündungsreaktion. Zytokine, wie z. B. Interleukine, Interferone, Chemokine und Tumornekrosefaktoren sind Wachstumsfaktoren und erleichtern Immunzellen die Migration zum Infektionsherd. Monozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen bilden die Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen. Sie verbinden angeborenes und adaptives Immunsystem, indem sie Pathogene identifizieren, aufnehmen und schließlich mittels Antigenpräsentation im lymphatischen Gewebe präsentieren. Alle Hauptklassen der Lymphozyten, die T-Zellen, die B-Zellen und die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), werden daraufhin aktiviert [55, 56]. Die Granulozyten sind mit bis zu 75 % die größte Gruppe der Leukozyten und bilden einen weiteren Teil des phagozytären Systems. Sie werden je nach Färbeverhalten in Eosinophile, Basophile und Neutrophile eingeteilt. Eosinophile sind, wie Mastzellen, bei der allergischen Entzündungsreaktion beteiligt und Basophile spielen bei der parasitären Infektion eine wichtige Rolle. Neutrophile Granulozyten werden bei bakteriellen Infektionen mobilisiert [55]. Das Komplementsystem ist ein weiterer wichtiger Teil der angeborenen Immunität. Es setzt sich aus unterschiedlichen Plasmaproteinen zusammen und wird über eine enzymatische Kaskade aktiviert. Das Komplementsystem kann chemotaktisch wirken und dient der Zerstörung der pathogenen Mikroorganismen. Die Erkennung von Pathogenen beruht auf charakteristischen pathogenassoziierten Struktur molekülen, den sog. *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs). PAMPs sind sich wiederholende unveränderliche Strukturmuster auf Krankheitserregern, wie Bakterien, Viren oder Pilzen. Sie werden von extra- oder intrazellulär membrangebundenen Rezeptoren und Molekülen auf Immunzellen, den sog. *pattern recognition receptors* (PRR), erkannt. Wird ein PAMP von einem dieser spezifischen Mustererkennungsrezeptoren gebunden, werden proinflammatorische Zytokine und Chemokine ausgeschüttet, die weitere Immunzellen anlocken und den Eindringling abwehren. Darauf folgend wird das adaptive Immunsystem aktiviert und es kommt zur endgültigen Beseitigung des

Pathogens. Neben den PAMPS erkennen die PRR auch weitere gefahrenvermittelnde Moleküle, die sog. *damage associated molecular patterns* (DAMPs). DAMPs sind körpereigene Strukturen, die nicht der physiologischen Morphologie entsprechen oder Moleküle, die in einem für sie nicht physiologischen Milieu zu finden sind. So sezernieren bspw. nekrotisierende Zellen DAMPs aus dem Zytoplasma in den Extrazellulärraum, wo sie von PRR erkannt werden und eine nicht-infektiöse Entzündungsreaktion auslösen [57].

Je nachdem auf welcher Zelle die Rezeptoren der angeborenen Immunität lokalisiert sind, haben sie eine bestimmte Funktion. Chemotaktische Rezeptoren binden bakterielle Peptide und locken Neutrophile Granulozyten an. Manche PRR nehmen, über die Induktion der Synthese und Ausschüttung von Signal- und Effektormolekülen, Einfluss auf die spezifische Immunantwort. PRRs auf Phagozyten dienen der Erkennung und Aufnahme von Pathogenen. Zu den wichtigsten Rezeptoren des unspezifischen Immunsystems zählen RIG-ähnliche Rezeptoren (RLH, *retinoic-acid-inducible protein-like helicases*) und Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR, *Toll-like receptors*). Daneben sind NOD-ähnliche Rezeptoren (*nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*, *NOD-like receptors*, NLR) weitere Rezeptoren der angeborenen Immunität. Durch das Zusammenwirken dieser drei Rezeptorarten und deren Signalkaskaden erfolgt die erfolgreiche angeborene Immunantwort [58-65].

1.4.2 Das erworbene Immunsystem

Gelingt die unspezifische Pathogenabwehr des angeborenen Immunsystems nicht, bedarf es der spezifischen Immunabwehr durch das adaptive Immunsystem. Die adaptive Immunität generiert, durch Induktion spezifischer Antikörper, eine individuell gegen ein Pathogen gerichtete Immunantwort. Die Antikörper werden auf rekombinanten Genen kodiert. Damit ist eine individuelle und spezifische Anpassung des Organismus auf Veränderungen des Erregerspektrums möglich. Zusätzlich bildet sich ein immunologisches Gedächtnis aus, das bei erneutem Kontakt mit dem Erreger eine verkürzte Reaktionszeit bedingt und einen langfristigen Schutz bietet. Lymphozyten sind als Effektorzellen die Basis der adaptiven Immunität. Sie werden in den Lymphknoten durch antigenpräsentierende Zellen aktiviert und werden in B- und T-Lymphozyten unterteilt. B-Lymphozyten sind für die humorale Immunantwort zuständig und formen nach Bindung eines bestimmten Antigens an einen Antikörper auf ihrer Zellmembran den sog. B-Zell-Rezeptor, die extrazelluläre Keimabwehr. Sie entwickeln sich nach Aktivierung zu

antikörperproduzierenden Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen und synthetisieren antigenspezifische Antikörper. Die intrazelluläre Immunantwort erfolgt durch T-Lymphozyten. Diese binden mit ihrem T-Zell-Rezeptor an infizierte Zellen, die Antigene an membranständigen Major Histocompatibility Complex Molecules (MHC-Moleküle) präsentieren. Antigenpräsentierende Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, als auch B-Zellen, präsentieren den Zellen der adaptiven Immunität (T-Zellen) so die prozessierten Erregerfragmente. Somit stellen die antigenpräsentierenden Zellen eine Verbindung zwischen der unspezifischen Immunabwehr und der spezifischen Immunabwehr dar [28, 66]. Es werden zwei Klassen von MHC-Molekülen unterschieden: MHC-Klasse I-Moleküle (oder auch Humanes Leukozyten Antigen-I-Rezeptoren, HLA-I-Rezeptoren) werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert. MHC-Klasse II-Moleküle (HLA-II-Rezeptoren) sind vor allem auf B-Lymphozyten und Antigenpräsentierenden Zellen lokalisiert. MHC-I bindet Antigene, die nach Zerlegung im Proteasom als Peptide an der Zelloberfläche präsentiert werden. Dabei werden körpereigene Antigene oder von Viren stammende Antigene, die sich im Zytosol aufhalten und eigene virale Proteine synthetisieren, mittels MHC-Klasse-I Proteinkomplexen präsentiert. Vor allem zytotoxische CD8-positive T-Zellen binden an MHC-I tragende Zellen und leiten den programmierten Zelltod (Apoptose) ein. MHC-I Moleküle sind vorrangig für die immunologische Diskrimination zwischen eigen und fremd und die Abwehr von autoimmunen Reaktionen wichtig. MHC-II präsentiert extrazelluläre Antigene. Fragmente fremder Pathogene werden nach intrazellulärem Abbau auf MHC-II-Rezeptoren den CD4-positiven T-Helferzellen präsentiert. Die CD4-positive T-Zelle kann daraufhin die antigenpräsentierenden Zellen aktivieren oder die B-Zellen zur hochselektiven Synthese spezifischer Immunglobuline veranlassen. Die Aktivierung der zellulären Komponente der adaptiven Immunität und die darauffolgende Erregerabwehr sind sehr zeitaufwendig und können nur effektiv zur Keimabwehr führen, wenn die primäre Immunität die Infektion zuvor begrenzt [55, 66, 67].

Neben den B- und T-Zellen und den antigenpräsentierenden Zellen sind Akute-Phase-Proteine, das Komplementsystem, Zytokine, Interferone und andere Mediatoren wesentlich an der erworbenen Immunantwort beteiligt [68].

1.4.3 Interferon-regulierende Faktoren

Interferone (IFNs) induzieren die primäre Immunantwort nach Virusinfektionen: IFN-stimulierte Gene behindern die Virusreplikation sowie die Virusausbreitung und bewirken eine Immunantwort. Die Gruppe der Interferon-regulierenden Faktoren (IRFs) sind Transkriptionsfaktoren. Diese regulieren die Abwehrvorgänge, z.B. durch Induktion von IFNs.

Neben NF- κ B gehört die Familie der immunregulatorisch wirksamen Interferon-regulierenden Faktoren (IRFs) zu den am besten untersuchten Vermittlern des TLR-Signalings. Als Transkriptionsfaktoren regulieren sie nicht nur das unspezifische und spezifische Immunsystem. Auch außerhalb der Immunantwort haben sie weitreichende Funktionen. Sie sind bspw. für Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Onkogenese von großer Bedeutung. Bislang sind im Säugerorganismus neun verschiedene IRFs bekannt [69].

IRFs liegen im inaktiven Zustand überwiegend im Zytoplasma vor [70]. Die IRF-Proteine haben einen homologen strukturellen Aufbau und mehrere funktionelle Domänen. Die N-terminale DNA-Bindungsdomäne (DBD) ist bei allen IRFs identisch. Sie erkennt DNA-Sequenzen, die als *IFN-stimulated response elements* (ISRE) bezeichnet werden und besteht aus einem rund 120 Aminosäureeinheiten umfassenden Helix-Turn-Helix-Motiv mit fünf tryptophanhaltigen Restmolekülen. DNA Sequenzen im Promotorbereich verschiedener Gene können mit dem N-Terminus erkannt und gebunden werden [71]. Am C-Terminus ist eine IRF-Assoziationsdomäne (IAD) lokalisiert, deren Morphologie zwischen den einzelnen IRFs variiert. Diese Domäne ermöglicht die Interaktion mit weiteren Faktoren, wie Faktoren der IRF-Familie. Sie hat eine regulatorische Funktion, wird durch Phosphorylierung aktiviert und bedingt die Homo- bzw. Heterodimerisierung mit der anschließenden Translokation in den Zellkern. Abhängig vom jeweiligen Interaktionspartnern und der Expression in unterschiedlichen Zelltypen agieren die einzelnen IRF-Mitglieder sowohl aktivierend (IRF1, IRF3, IRF5, IRF9), als auch unterdrückend (IRF8) oder aktivierend und unterdrückend (IRF2, IRF4, IRF7). IRF3 und IRF7 sind die wichtigsten Induktoren von Typ I IFN beteiligt. Daneben sind auch IRF1 und IRF5 sowie IRF8 in der Lage die Genexpression von Typ I IFN zu regulieren. Im Rahmen der angeborenen Immunabwehr induzieren IRF1, IRF3, IRF4, IRF5 und IRF8 weitere proentzündliche Zytokine. IRF1, IRF2, IRF4 sowie IRF8 regulieren die Immunzellenentwicklung und sind somit an der spezifischen Immunantwort beteiligt. IRF1, IRF3, IRF5 und IRF8 haben wichtige Funktionen in der Kontrolle des Zellwachstums und der Onkogenese [72]. IRF3 wird in den meisten Zellen exprimiert und liegt in großen Mengen im Zytosol vor. Es wird nach einer Virusinfektion durch

Phosphorylierung aktiviert und induziert die Synthese von verschiedenen Chemokinen, IFN- β und IFN- α 4. Es aktiviert jedoch nicht die restlichen IFN- α -Gene [73]. IRF7 wird transkriptionell reguliert und im Gegensatz zu IRF3 nicht konstitutiv exprimiert. IRF7 ist ein potenter Aktivator beider IFN-Gene, IFN- α und IFN- β , wobei in vitro Studien gezeigt haben, dass IRF7 hauptsächlich IFN- α 8 stimuliert [74]. Somit kann angenommen werden, dass die Funktion von IRF3 in der frühen antiviralen Abwehr liegt, während IRF7 für die späte effiziente Immunantwort verantwortlich ist [75]. Seine Expression wird erst nach viraler Infektion durch IFN-I gesteigert. Es entsteht eine positive Rückkopplungsreaktion, die eine zweiphasige potente Immunantwort bedingt. Zusätzlich spielt IRF7 eine Rolle in der Monozyten- und Makrophagendifferenzierung [74]. Eine weitere entscheidende Rolle für IFN-Genexpression haben IRF2 und IRF9, wobei IRF2 als Inhibitor und IRF9 als Aktivator wirkt [74].

IRF1 und IRF5 nehmen auch einen Einfluss auf das Typ-I IFN-System. IRF1 trägt zur Entwicklung und Differenzierung von Immunzellen bei [74]. Daneben konnten Studien beschreiben, dass IRF1 in seiner wachstumshemmenden und proapoptotischen Funktion von IRF2 kompetitiv gehemmt wird. Kommt es zur Überexpression von IRF2 kann das zur Onkogenese führen. Zudem reguliert es den Zellzyklus und beeinflusst Apoptosevorgänge. Die IRF1-Defizienz im humanen Genom geht mit der Leukämie oder dem myelodysplastischen Syndrom einher [69, 74]. In Analysen konnte gezeigt werden, dass IRF1 in der frühen Inflamationsreaktion nach renaler IRI vermehrt produziert wird und durch Induktion von proentzündlichen Mediatoren zur Gewebeschädigung beiträgt. Verglichen mit Wildtyptieren zeigten IRF1-Knockoutmäuse nach renaler IRI eine verminderte Entzündungsreaktion mit verbesserter Nierenfunktion und reduziertem Gewebeschaden [76]. Das IRF5-Gen kommt beim Menschen in mehreren Splice-Varianten vor. Eine Hauptfunktion besteht in der transkriptionellen Regulation früh-inflammatorischer Zytokine und Chemokine. Durch die Induktion von Faktoren, wie TNF- α , IL-6 und IL-12 wirkt IRF5 hierbei proinflammatorisch. Das Zytokin IFN- α scheint IRF5-unabhängig induziert zu werden [74]. Nach Aktivierung von TLR4, TLR5, TLR7 und TLR9 wird IRF5 durch Bindung an MyD88 aktiviert. Darauf folgt die Dimerisierung und Translokation in den Zellkern, wo IRF5 zusammen mit NF- κ B die Expression von proinflammatorischen Mediatoren induziert [75]. Zusätzlich scheint IRF5 eine antivirale Wirkung zu haben [74]. Es konnte gezeigt werden, dass es bei Virusinfektionen virusspezifisch aktiviert wird und dass auch Typ-I IFN die IRF5-Genexpression induzieren [74]. Auch in der Zellzykluskontrolle scheint IRF5 eine große Bedeutung zu haben. Es kann zu Zellzyklusarrest und Apoptose geschädigter Zellen führen [69, 74]. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass es durch konstitutive IFN- α Produktion bei

IRF5-Gen-Mutationen zu Autoimmunreaktionen und Erkrankungen wie dem Systemischen Lupus erythematoses kommt.

IRF4 ist ein kompetitiver Inhibitor von IRF5, indem es die IRF5-Bindungsstelle am MyD88-Molekül blockiert. Als Transkriptionsfaktor ist das ausschließlich in hämatopoetischen Zellen vorkommende IRF4 v. a. für die Lymphozytenaktivierung und deren Differenzierung von Bedeutung. Daneben wirkt IRF4 als Negativregulator in TLR-Signalkaskaden, wenn die DNA-Bindungsdomäne nicht involviert ist [75]. Es hemmt die entzündungsfördernde Wirkung von IRF5, nicht aber die Wirkung von IRF7, das auch an MyD88 bindet. IRF4 erkennt die zentrale Region von MyD88 und damit die MyD88-Bindungsstelle von IRF5 und nicht die sog. death-Domäne am MyD88-Molekül, die von IRF7 gebunden wird [75, 77]. IRF4 nimmt, als wichtiger Regulator der adaptiven Immunität, eine Sonderstellung in der Gruppe der IRF ein. Er wird als einziger Faktor nicht durch IFN induziert [69, 78]. Es beeinflusst die Reifung von B-Zellen und Plasmazellen, reguliert den Antikörperklassenwechsel und das systemische Zytokinprofil. IRF4 wird durch die TLR-Signalkaskade aktiviert und teils konstitutiv exprimiert [75]. Einige Untersuchungen konnten belegen, dass IRF4 die proinflammatorische Funktion von IRF5 reduziert. So wurde in Experimenten zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gezeigt, dass durch die Stimulation mit Muramidyl Dipeptiden, als Bestandteile von Bakterien, die Expression von IRF4 zunimmt und die schädliche Entzündungsreaktion reduziert wird [79]. Bei IRF4-Defizienz peritonealer Makrophagen konnten nach LPS-Stimulation erhöhte proinflammatorische Zytokin- und Chemokinwerte bestimmt werden [80]. Darüber hinaus beeinflusst IRF4 die IL-10-Expression, was für die makrophagenvermittelte Auflösung von Entzündungen wichtig ist [81, 82]. *Satoh* hat gezeigt, dass der *Jumonji domain containing-3 pathway*, der die IRF4-Expression reguliert, für die M2-Makrophagenpolarisation bei Mäusen, die Chitin oder einer parasitären Infektion ausgesetzt sind, unerlässlich ist [83]. Ein IRF4-Mangel führt nachweislich zu einer verminderten Expression von M2-Makrophagen Markern, wie *Arg1*, *Ym1* und *Fizz1* [83]. Des Weiteren ist IRF4 ein potenter Negativregulator auf Ebene der DNA. Hier löst es durch Antagonisierung von Genen der TNF-Familie die Apoptose in Tumorzellen aus [84, 85]. Da IRF4, wie auch IRF8, alleinig in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, können hämatoonkologische Erkrankungen, wie das T-Zell-Lymphom und das Multiple Myelom, mit der IRF4-Überexpression einhergehen [86]. Beim Multiplen Myelom kommt es durch Translokation des IRF4-Gens in den Bereich der Immunglobulin-Schwerketten-Lokusse zur vermehrten Induktion von IRF4. Auch Viren, wie der Epstein-Barr-Virus können durch erhöhte IRF4-Expression zu Lymphomen führen [78, 86]. IRF4 und IRF8 sind wichtige Mediatoren in der Regulation der Funktion und

Entwicklung von immunmodulatorischen Zellen wie Makrophagen, Dendritischen Zellen (DCs), sowie T- und B-Zellen [78]. Beide haben eine schwache DNA-Bindungsaktivität, die durch Faktoren wie E47 und weitere IRF, wie IRF1 und IRF2 erhöht wird [74]. In regulatorischen T-Zellen unterdrückt IRF4 die Th2-Immunantwort und kontrolliert diese damit [87]. Auch die Differenzierung der Th17-Zellen wird durch IRF4 reguliert. Im IRF4-Knockout tritt die autoimmune Enzephalomyelitis, die mit Th17-Zellen assoziiert ist, nicht mehr auf [88]. Der IRF8-Knockout resultiert in einer verstärkten Infektanfälligkeit durch vermehrte IL-12 Produktion und eine fehlerhafte Th1-Immunantwort [74]. Daneben tragen IRF8 und zum geringen Anteil auch IRF4, über die Regulation von Typ-1-Interferon-produzierenden plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC), zur antiviralen Abwehr bei. Auch für die Entwicklung der Untergruppen der DCs spielen IRF4 und IRF8 eine wesentliche Rolle. IRF4 ist ein wichtiger Regulator der Entwicklung CD4-positiver DCs und IRF8 bedingt die Entwicklung CD8 α -positiver DCs. Zusammen sind IRF4 und IRF8 für die Entwicklung der CD4(-)CD8 α (-) DCs verantwortlich [74, 89]. Im Modell der zeitgleichen IRF4- und IRF8-Defizienz kam es zum Arrest der B-Zellentwicklung mit Hyperproliferation von Prä-B-Zellen. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass IRF4 und IRF8 auch an der B-Zell-Entwicklung maßgeblich beteiligt sind. IRF4 ist durch Regulation von Rekombinationsprozessen zur Rezeptoreditierung zusätzlich von großer Bedeutung für die Immunglobulinsynthese und für die Ausbildung der Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen [90]. In IRF4-defizienten Mäusen kommt es zum gänzlichen Ausbleiben der Plasmazellentwicklung und die Keimzentren in Lymphknoten und Milz fehlen. IRF4 ist folglich für die Differenzierung von Plasmazellen von großer Bedeutung [78, 91].

1.4.4 Immunreaktionen durch Ischämie-Reperfusion in der Niere

Neben der hypoxiebedingten Zellschädigung, ist auch das Immunsystem an der Verschlechterung der Nierenfunktion nach akuter Nierenschädigung beteiligt [50]. Insbesondere das angeborene Immunsystem wirkt hierbei nicht nur protektiv, sondern trägt auch zur Entstehung eines CAANV bei. Die Entzündungsreaktion nach IR beginnt mit dem Influx von Immunzellen. Die frühe Leukozytenmigration, durch Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Leukozyten, ist für die Auslösung der sterilen Entzündungsreaktionen von großer Bedeutung. Auch die T- bzw. B-Zell-Antwort der adaptiven Immunität trägt zu Entzündungsreaktionen bei IR bei [92]. So konnte in Experimenten gezeigt werden, dass T-Zellen bei IR entzündungshemmend

wirken [93]. Die endotheliale Permeabilität nimmt durch Zytokine, die von T-Zellen produziert werden, zu [94]. Die Schädigung im Rahmen der IR wird durch CD4-positive T-Zellen verstärkt. CD8-positive T-Zellen scheinen den IR-Schaden jedoch nicht zu beeinflussen [95].

Neben den Immunzellen tragen TECs aktiv zum Entzündungsgeschehen bei. Sie setzen Zytokine und Chemokine frei und exprimieren vermehrt TLRs. Unter oxidativem Stress sezernieren sie z. B. Transkriptionsfaktoren, wie IRF-1, die die Synthese weiterer proinflammatorischer Zytokine induzieren [76]. Im Rahmen des Polaritätsverlustes der TECs bei IR geht der Komplement-inhibierende Faktor *Crry* verloren. Daraufhin werden an der Basalmembran der Tubuluszellen eine Reihe von Faktoren des alternativen Wegs der Komplementaktivierung aktiviert [96, 97]. Des Weiteren sind TECs in der Lage sich in semiprofessionelle Phagozyten zu differenzieren. Ein weiterer Beitrag zum Entzündungsgeschehen bei AKI trägt vermutlich das Oberflächenmolekül *KIM1*, das von lädierten Tubuluszellen exprimiert wird und die Phagozytose induziert [98]. Hypoxiegeschädigte nekrotisierende Zellen setzen DAMPs frei, die von TLR und anderen Rezeptoren gebunden werden und eine sterile Entzündung hervorrufen. Makrophagen und DCs induzieren die frühe inflammatorische Reaktion nach IR [99]. DCs bedingen die Antigenerkennung und die Antigenpräsentation von Molekülen, die zuvor als pathogen erkannt wurden. Sie detektieren jedoch nicht nur Krankheitserreger, Mikroorganismen und Fremdstoffen, sondern auch Bestandteile aus körpereigenen nekrotischen Zellen (DAMPs) [55]. Die DCs wandern nach Aktivierung und Differenzierung ins lymphatische Gewebe und induzieren dort durch Stimulation der T-Lymphozyten, die adaptive Immunabwehr [100, 101]. Die aktivierten T-Zellen wandern daraufhin in das entzündete Gewebe. Somit sind die DCs für die Induktion einer adaptiven Immunantwort von erheblicher Bedeutung.

Als Effektorzellen der angeborenen Immunität reagieren Makrophagen auf spezifische Umweltbedingungen, indem sie unterschiedliche Phänotypen einnehmen. Anhand von *in-vitro*-Studien wurden sie, entsprechend ihrer Eigenschaften, in zwei Gruppen eingeteilt: Die klassisch aktivierten Makrophagen (M1-Makrophagen) sowie die alternativ aktivierten Makrophagen (M2-Makrophagen) [102]. *In vivo* sind die Makrophagen jedoch mit komplexeren Umgebungsfaktoren konfrontiert. Entsprechend des umgebenden Milieus weist der Makrophagen-Phänotyp eine bedeutende Flexibilität auf. Eine strikte Zuteilung in eine Makrophagen-Subgruppe ist für die Situation *in vivo* nicht möglich [103, 104]. Durch den Wechsel zwischen den Subgruppen können Makrophagen, in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen, ihren Aktivitätszustand anpassen und damit unterschiedlichen Einfluss auf das Gewebe ausüben [103]. M1-Makrophagen werden durch PAMPs und DAMPs sowie proinflammatorische Zytokine induziert und exprimieren IL-1R,

major histocompatibility complex II (MHC II) und *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). Sie sezernieren hohe Level an reaktiven Sauerstoffspezies, Stickstoffmonoxiden sowie proinflammatorische Zytokine, wie IL-23, IL-12 und TNF-alpha [104]. Der Phänotyp der M2-Makrophagen wird z. B. über IL-4 und IL-13 induziert. M2-Makrophagen exprimieren v. a. antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und produzieren *mannose receptor* (MR) und *arginase 1* (Arg1) [102, 105]. Während der hypoxiebedingten akuten Nierenschädigung setzen nekrotisierende Tubuluszellen DAMPs frei. Diese aktivieren TLRs in den migrierenden Makrophagen und induzieren den proentzündlichen Phänotyp von M2-Makrophagen [106, 107]. Im Rahmen der Phagozytose zugrunde gegangener apoptotischer Gewebe- und Immunzellen wird der Phänotypen-Wechsel von M1-Makrophagen hin zu M2-Makrophagen induziert. Die antiinflammatorischen M2-Makrophagen fördern die Beendigung der primären Entzündungsreaktion und leiten den Heilungsprozess ein [106]. In Studien konnte gezeigt werden, dass M1-Makrophagen den funktionellen und histologischen Schaden nach akuter Nierenschädigung verstärken. Demgegenüber wirken M2-Makrophagen protektiv. Sie führen zur Auflösung der akuten Entzündungsreaktion und vermitteln die renale Heilung [108]. Werden Makrophagen vor Initiierung des ANV depletiert, verringert sich die akute renale Schädigung [109, 110]. Die Makrophagendepletion einige Tage vor der Induktion des hypoxischen ANV führt zur Hemmung der Makrophagenpolarisierung in Richtung M2-Makrophagen. Dies resultiert in einer verlängerten Nierenschädigung [111]. Die Polarisierung der Makrophagen übt somit Einfluss auf die Regenerations- und Heilungsprozesse nach ANV aus. Durch Regulation des Makrophagenphänotyps könnte somit der Entwicklung des CAANVs entgegengewirkt werden.

1.5 Der Einfluss von IRF4 auf das CAANV

In Voruntersuchungen zu dieser Dissertation wurden am LMU Klinikum bereits Versuche mit den IRF4-defizienten Mäusen durchgeführt. Hierbei lag der Fokus auf der Evaluation der Rolle von IRF4 beim akuten Nierenversagen. Im Modell der akuten Nierenschädigung wurden bei IRF4-defizienten Mäusen verstärkte Entzündungsreaktionen, vermehrte Parenchymschäden und ein Funktionsverlust der Niere beobachtet. Bei IRF4-defizienten Mäusen kam es zu verstärkter Phagozytenmigration und vermehrter Sekretion von Tumornekrosefaktoren (TNFs) [112]. Folglich wirkt IRF4 als negativer Regulator bei akuten Entzündungsreaktionen nach IR. Es wurde gezeigt, dass die renale IRF4-Basisexpression sehr gering ist. Jedoch wird IRF4 in vitro durch Stimulation

mit Sauerstoffradikalen und in vivo durch Ischämie-Reperfusion der Niere induziert. Folglich bedingt oxidativer Stress die Induktion von IRF4. Die IRF4-Konzentration steigt 24 Stunden nach Ischämie-Reperfusion an. Ab dem fünften Tag nach Ischämie-Reperfusion *Injury* (IRI) war die Expression von IRF4 signifikant angestiegen (Abbildung 1A). Demnach scheint die zunächst in Gang gesetzte Entzündungsreaktion, zeitlich verzögert durch IRF4, wieder begrenzt zu werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die IRF4-Defizienz das Ausmaß des ANV verstärkt. 24 Stunden nach 45-minütiger bilateraler IR bei Wildtyp-Mäusen wurden Kreatinin- und Harnstoffwerte, als Indikatoren für das ANV, im Serum der Tiere bestimmt. IRF4-defiziente Mäuse zeigten signifikant höhere Werte als Wildtyp-Tiere (Abbildung 1B). Auch histologisch und auf molekularbiologischer Ebene bestätigte sich die Hypothese, dass IRF4 ein Regulator des ANV ist, indem IRF4 die Intensität des ANV mindert. IRF4-defiziente Mäuse zeigten nach unilateraler Abklemmung von Nierengefäßen einen verstärkten Tubulusschaden, verglichen mit Wildtyp-Mäusen (Abbildung 1C). IRF4-defiziente Tiere hatten, verglichen mit Wildtyp-Tieren, einen Tag nach 45-minütiger IRI signifikant höhere Zytokin- und Chemokinwerte. Das Zytokin IL-6, welches v. a. von proinflammatorischen M1-Makrophagen exprimiert wird, blieb zusätzlich fünf Tage nach Reperfusion signifikant erhöht. Nach zehn Tagen war die Expression von IL-6 weiterhin erhöht, jedoch nicht mehr signifikant (Abbildung 1D). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die IRF4-Defizienz eine stärkere inflammatorische Reaktion nach IR bedingt. Dies führt zu einer verstärkten Schädigung der renalen Tubuluszellen. Des Weiteren deutet die erhöhte Expression von IL-6 bei IRF4-Defizienz, bis zehn Tage nach IRI, auf eine verlängerte Aktivierung von proinflammatorischen M1-Makrophagen hin. Zusätzlich wurde in Vorexperimenten die Rekrutierung von Makrophagen im Modell des ANV untersucht. Verglichen wurde hierbei die Anzahl an immunhistochemisch gefärbten F4/80-positiven Makrophagen in postischämischen Nieren von IRF4-defizienten und Wildtyp-Tieren, jeweils 24 Stunden, 5 Tagen und 10 Tagen nach IRI. Es konnte kein quantitativer Unterschied zwischen der Makrophagenrekrutierung von IRF4-defizienten und Wildtyp-Tieren festgestellt werden. Allerdings wiesen die IR-Nieren deutlich mehr Makrophagen auf als die Kontrollnieren (Abbildung 1E). Somit wurde davon ausgegangen, dass IRI die renale Makrophagenrekrutierung erhöht. Die IRF4-Defizienz nahm hingegen keinen Einfluss auf die Rekrutierung von Makrophagen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass IRF4 in renalen DCs antiinflammatorische Wirkung hat. IRF4 supprimiert hierbei die TNF- α -Sekretion. Somit kann davon ausgegangen werden, dass IRF4 ein induzierbarer immunmodulatorischer Faktor in der postischämischen Niere ist. Als negativer Regulator verhindert IRF4 eine überschießende akute Inflammation mit konsekutivem Gewebeschaden [112].

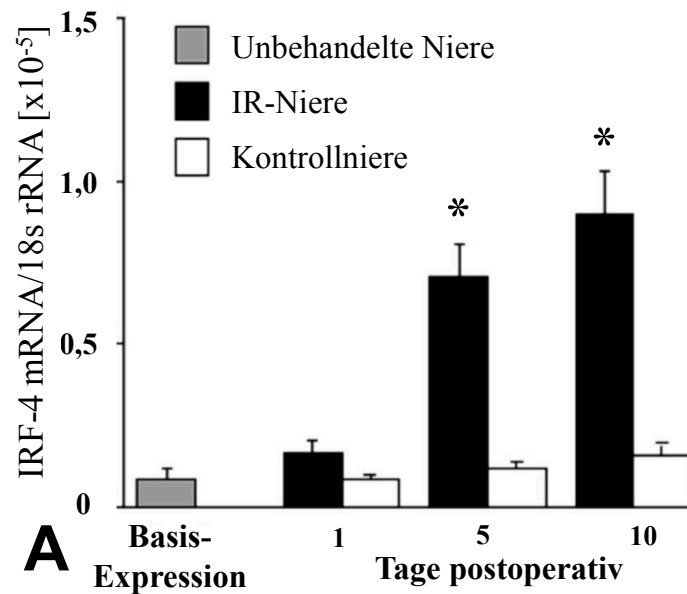


Abbildung 1A: IRF4-mRNA-Level nach renaler IRI. Nach unilateraler 45-minütiger IRI bei Wildtyp-Mäusen wurde die IRF4-Expression mittels qPCR getestet. Grauer Balken entspricht der IRF4-Basisexpression aus nicht-operierten Tieren. Die Expression von IRF4 nimmt im zeitlichen Verlauf kontinuierlich zu. Ab dem fünften Tag steigt IRF4 signifikant an (modifiziert nach [112, 113]).

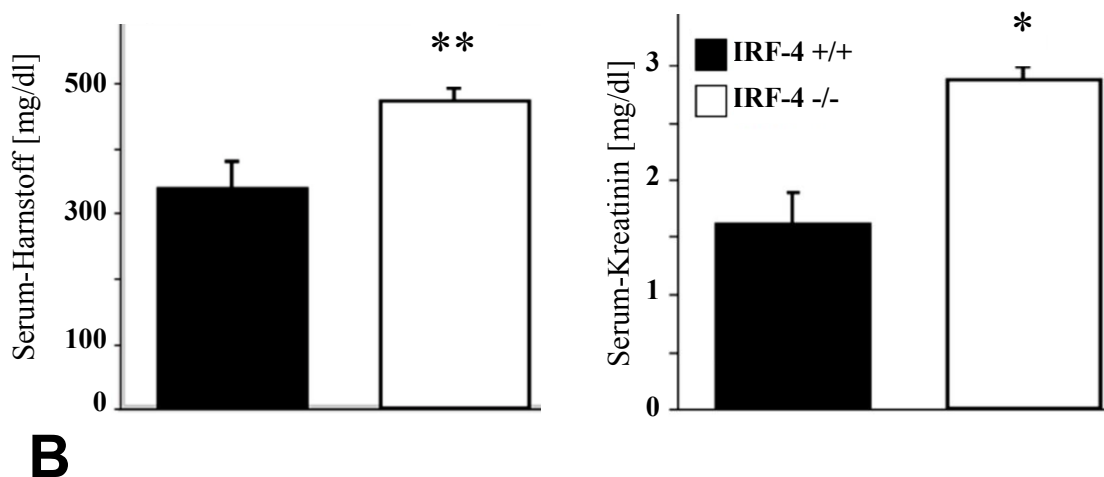
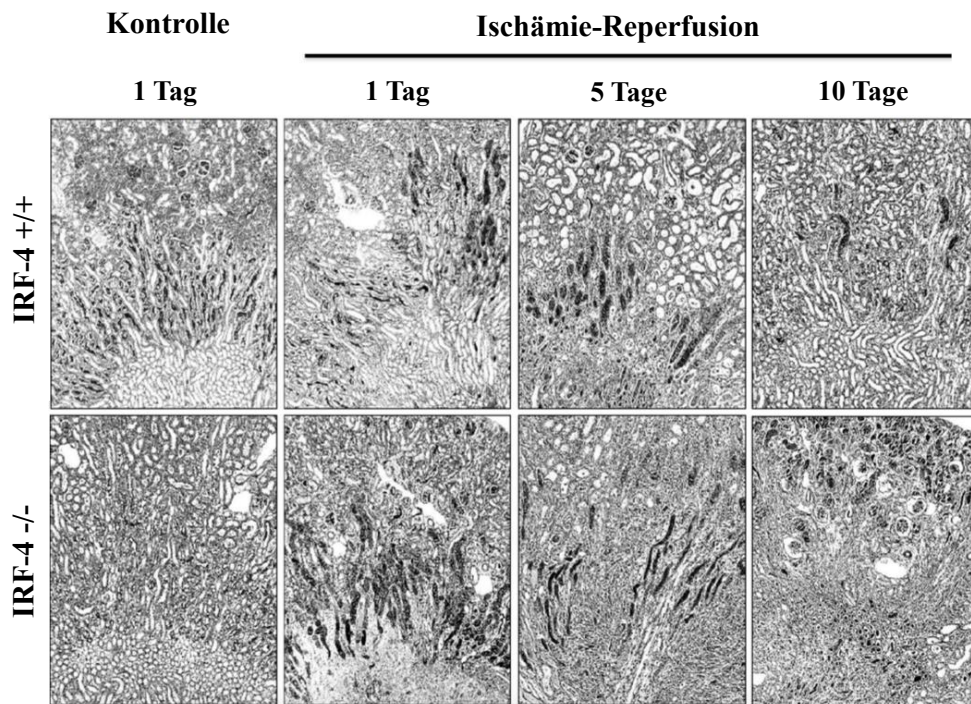
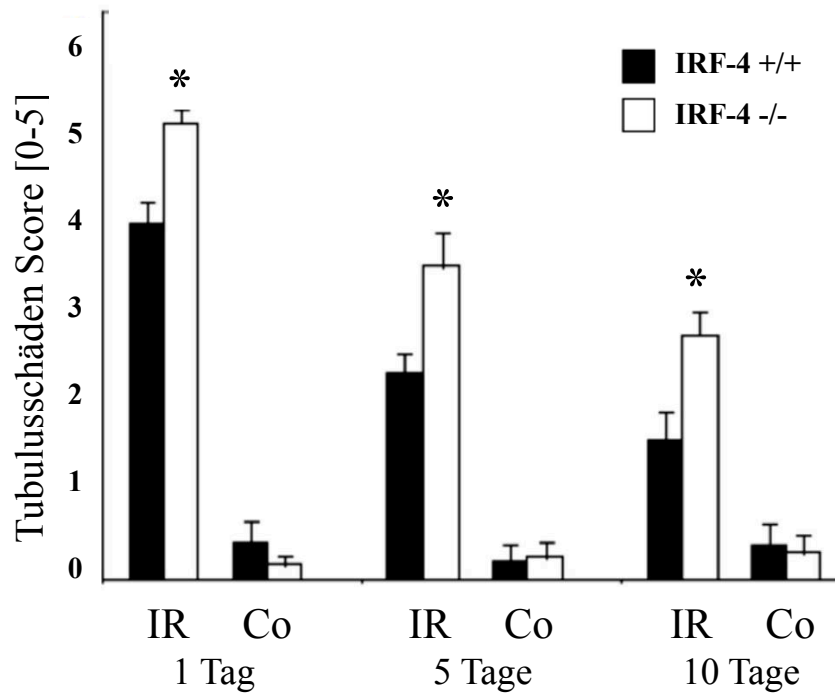


Abbildung 1B: Harnstoff- und Kreatininwerte im Serum. Nach 45-minütiger bilateraler Abklemmung der Nierengefäße zeigten IRF4-defiziente Mäuse signifikant höhere Serumharnstoff- und Serumkreatininwerte als Wildtyp-Tiere (modifiziert nach [112, 113]).



C

Abbildung 1C: Tubulusschäden nach IR. Nach IR für 45 Minuten an IRF4-defizienten- und Wildtyp-Mäusen wurden die Nieren mittels PAS-Färbungen gefärbt. Im Anschluss wurden die tubulären Schäden semiquantitativ evaluiert. Gezeigt sind die IR- und der *sham*-operierten Nieren (Kontrollnieren) nach 1, 5 und 10 Tagen. Die tubulären Schäden waren bei IRF4-knockout-Mäusen verglichen mit den Wildtyp-Mäuse zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant höher (modifiziert nach [112, 113]).

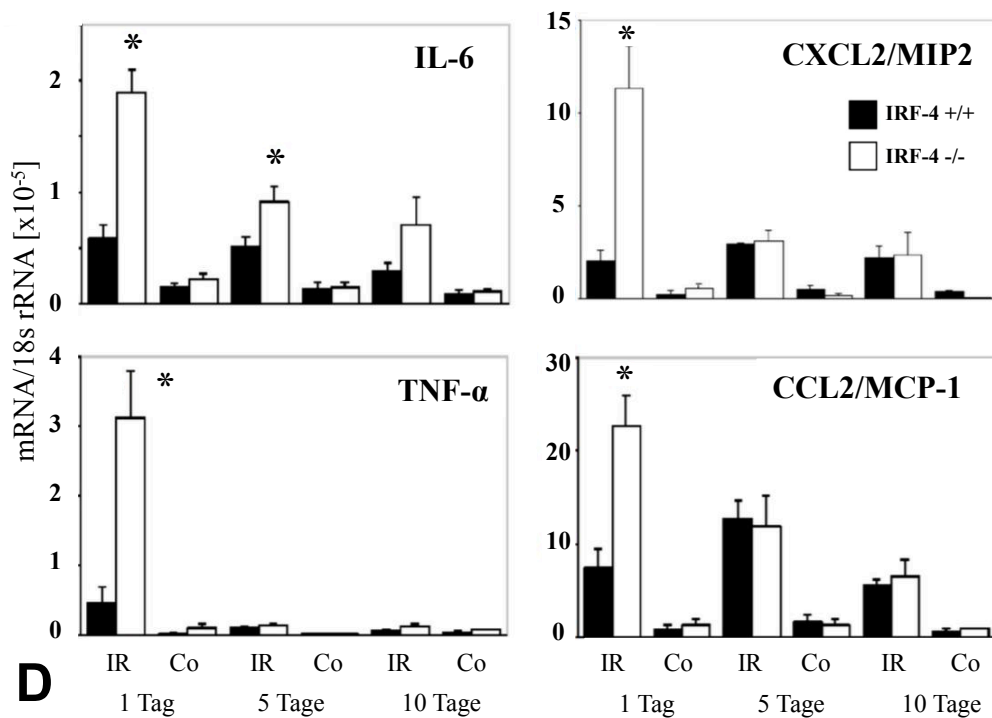


Abbildung 1D: Renale Zytokin- und Chemokinexpression nach IR. Nach unilateraler 45-minütiger IR, Isolation der RNA, wurde die Zytokin- und Chemokinexpression mittels qPCR ermittelt. IRF4-knockout-Tiere zeigen eine signifikant erhöhte renale Zytokin- und Chemokinexpression (modifiziert nach [112, 113]).

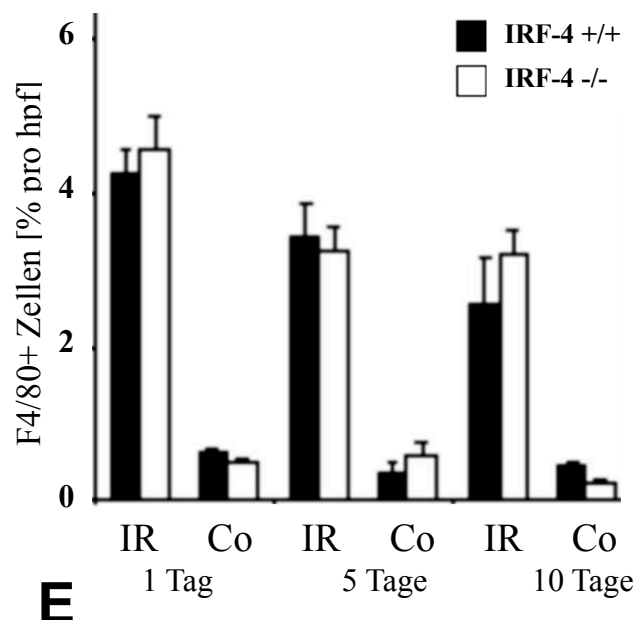


Abbildung 1E: F4/80-Makrophagen nach renaler IRI. Nach unilateraler renaler Ischämie wurden Makrophagen mit F4/80 angefärbt. Quantitativ Auswertung der F4/80+ Zellen. Es zeigte sich kein Unterschied der Makrophagenanzahl zwischen IRF4-defizienten- und Wildtyp-Tieren in den operierten Nieren und den Kontrollnieren. IR (IR-Niere), Co (Kontrollniere). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Min. fünf Tiere pro Gruppe. Die Fotos sind repräsentative Schnitte, 100-/ 200-fach vergrößert, * $p < 0,01$ vs. Wildtyp, ** $p < 0,05$ vs. Wildtyp (modifiziert nach [112, 113]).

1.6 Ziel des Projekts und Hypothese

Nach akuter Nierenschädigung kommt es zur Entwicklung einer Entzündungsreaktion. In Voruntersuchungen konnten wir zeigen, dass IRF4, als negativer Regulator der Entzündung, die primäre Immunantwort nach akuter Nierenschädigung hemmt. Neben der Hemmung der primären Immunantwort, mindert es Parenchymschäden und erhält letztendlich die Nierenfunktion [112]. Welche Rolle jedoch IRF4 beim CAANV spielt wurde bisher nicht untersucht. Um die Rolle von IRF4 beim CAANV zu untersuchen, haben wir die Nieren von IRF4-defizienten und Wildtyp-Mäusen im Langzeitverlauf nach einseitiger Ischämie-Reperfusion untersucht.

Für diese Dissertation ergaben sich folgende Überlegungen: (1) M2-Makrophagen spielen eine wichtige Rolle bei der Regeneration nach ANV und tauchen erst einige Tage nach dem akuten Nierenschaden auf. (2) IRF4 bestimmt, als negativer Regulator, das Zytokinmilieu nach akuter Nierenschädigung und hemmt die Expansion von proinflammatorischen M1-Makrophagen. (3) IRF4 wird in der späten Phase der Regeneration nach akuter Nierenschädigung benötigt. IRF4 induziert einen Phänotypenwechsel der Makrophagen zu einem antientzündlichen M2-Makrophagen Subtyp. (4) IRF4-Defizienz führt zu einem prädominanten proinflammatorischen M1-Makrophagen Phänotyp. Dadurch wird die Heilung der Niere gehemmt. (5) Aufgrund der andauernden Entzündung kommt es zur Entwicklung eines CAANV.

In dieser Dissertationsarbeit sollte untersucht werden, ob IRF4 die Entwicklung eines CAANV nach einem ischämischen akuten Nierenversagen beeinflusst. Die Ergebnisse können zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie des CAANV führen. Dadurch können neue Ansätze für Therapiekonzepte entwickelt werden. Des Weiteren kann das Fehlen von IRF4 als Risikofaktor für die Entstehung eines chronischen Nierenversagens angesehen werden.

Die Hypothese der vorliegenden Dissertationsarbeit lautet folgendermaßen:

IRF4 wird durch eine hypoxische Nierenschädigung induziert. Zur Auflösung der renalen Inflammation vermittelt IRF4 einerseits den Wechsel des vorherrschenden Makrophagen-Phänotyps: Vom klassisch-aktivierten proinflammatorischen Typ M1 zum alternativ-aktivierten Typ M2. Auf der anderen Seite beeinflusst es das systemische Zytokinmilieu so, dass es zur Wiederherstellung der Nierenfunktion kommt. Diese aktiv regulierten Prozesse ermöglichen die strukturelle und funktionelle Regeneration der Niere nach akuter Nierenschädigung. Damit hat IRF4 einen Einfluss auf die Entwicklung eines chronisch-auf-akute-Nierenversagens.

Kapitel 2

Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte und Materialien

| | |
|---|---------------------------------------|
| BioRad Semi-Dry Blotting System | BioRad, München, D |
| ELISA-Reader Tecan, GENios Plus | Tecan, Crailsheim, D |
| Entwickler Curix 60 | AGFA, Köln, D |
| FacsCalibur™ | BD Bioscience, Heidelberg, D |
| Gel-Elektrophorese-Kammer | PeqLab Biotechnologie, Erlangen, D |
| Gene Amp PCR System 9700 | PE Applied Biosystems, Illinois, USA |
| Homeothermic Blancet Control Unit und Temperature Probe | Panlab Bioreserch, Barcelona, Spanien |
| Lichtmikroskop Leitz Diavert | Leica Microsysteme, Bensheim, D |
| Lichtmikroskop Leitz DMRBE | Leica Microsysteme, Bensheim, D |
| Digitale Kamera DC 300F | Leica Microsysteme, Cambridge, UK |
| LightCycler-480 Real-time qPCR System | Roche, Mannheim, D |
| LightCycler 480 Multiwell Platte 96 (+ Klebefolie) | Roche, Mannheim, D |
| MACS-Micro-Beads-Magnet | Milteny Biotec, Berg.-Gladbach, D |
| Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell | BioRad, München, D |
| pH meter WTW | WTW GmbH, Weilheim, D |
| RNAlater (RNeasy Mini Kit) | Qiagen GmbH, Hilden, D |
| Schneidergerät | Jung CM 3000, Leica, Solms, D |
| Sonicator | Branson, Danbury, CT, USA |
| Spektrophotometer Beckman DU® 530 | Beckman Coulter, Krefeld, D |
| Sicherheitswerkbank, Microflow Klasse-2 | Nunc, Wiesbaden, D |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf, Hamburg, D |
| Ultra TURRAX T25 (Rotor-Stator-Homogenisator) | Ika-Werke, Staufen, D |
| UNO-II-Cycler (Thermocycler) | Biometra, Göttingen, D |
| UV-Licht | Bachofer Laborgeräte, Reutlingen, D |
| Vortex Genie 2™ | Scientific Industries, N.Y., USA |
| Sartorius-Waage BP110S | Sartorius AG, Göttingen, D |
| Waage Mettler PJ 3000 | Mettler Toledo, Gießen, D |
| Wasserbad HI 1210 | Leica Microsysteme, Solms, D |
| Yasargil Aneurysm Clip | Medicon, Tuttlingen, D |
| Yasargil Clip Applying Forceps | Medicon, Tuttlingen, D |
| Zellinkubator Type B5060 EC-CO ₂ | Heraeus Sepatech, Osterode, D |

| | |
|---|--|
| Zentrifuge Heraeus, Minifuge T | VWR International, Darmstadt, D |
| Megafuge 1.0R, Heraeus | Heraeus, Hanau, D |
| Hettich Zentrifuge | Hettich, Tuttlingen, D |
| Zählkammer-Neubauer | Roth, Karlsruhe, D |
| 24-well-Platten | Nunc, Wiesbaden, D |
| 6-well-Platten | Costar Corning, Schiphol-Rijk, Holland |
| Einbettkassetten | neoLab Migge, Heidelberg, D |
| 1,5ml-Gefäße ("Eppis") | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Falcons 15ml, 50ml | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Immobilon PVDF Transfermembran | Millipore, Schwalbach/Ts., D |
| Kodak BioMax XAR Film | Sigma Aldrich, Deisenhofen, D |
| MACS LS-Colums | Milteny Biotec, Berg.-Gladbach, D |
| Mersilene, Polyester, 2-0 | Ethicon, Belgien |
| Mikropipetten 20µl | Brand, Wertheim, D |
| Multikanalpipette Eppendorf Research | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| Nadeln BD Microlance 26 G x 1/2 | BD, Heidelberg, D |
| Nunc-Immuno™ 96 Microwell™ Plates | Nunc, Wiesbaden, D |
| Pipettenspitzen 1-1 000µl Typ Gilson® | Peske, Aindling-Arnhofen, D |
| Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| Pipetten Pipetman® P | Gilson, Middleton, WI, USA |
| Pipettierhilfe Pipetus® -classic | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D |
| Plastikfilter 70µm | BD, Heidelberg, D |
| Preseparationsfilter 30µm, 70µm | Milteny Biotec, Berg.-Gladbach, D |
| Skalpelle No. 20 | Feather Safety Razor Co., Japan |
| Spritzen BD Plastipak 1000µl, 5ml, 2ml | BD, Heidelberg, D |
| Sterile Mullkompressen 5x5cm | NOBA Verbandmittel, Wetter, D |
| Whatman-Papier | Millipore, Schwalbach/Ts., D |
| Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit | Thermo Fisher Scientific, Germering, D |
| Zellkulturschalen 10cm | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Zellschaber 24cm | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Zellsieb, Cell strainer 70µm | BD, Heidelberg, D |

2.2 Tierzucht und Tierhaltung

| | |
|-------------------------|--------------------------------|
| Makrolone Typ II Käfige | Tecniplast, Hamburg, D |
| Tierfutter | Ssniff Spezialdiäten, Soest, D |

| | |
|-----------------------|---|
| C57BL/6 Wildtyp-Mäuse | Charles River Laboratories, Sulzfeld, D |
|-----------------------|---|

| | |
|---|--|
| IRF4 ^{-/-} Mäuse (MGI ID: 2387941) in C57BL/6N Hintergrund | Mak T. W., Depatement of Biophysics, Universität Toronto |
|---|--|

Wir arbeiteten in dieser Studie mit IRF4-knockout-Mäusen (IRF4^{-/-}) und Mäusen des C57BL/6-Stammes gearbeitet. Die Versuchstiere für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente waren Wurfgeschwister und stammen aus der Tierzucht unserer Arbeitsgruppe. Eine homozygote Zucht von IRF4-defizienten Mäusen blieb erfolglos. Daher wurden ausschließlich heterozygote IRF4-defiziente Mäuse gezüchtet. Diese wurden in zehn Generationen in den C57BL/6N-Stamm rückgekreuzt [114]. Die Tiere wurden jeweils zu fünf in Käfigen mit Filterdeckel bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten und hatten unbegrenzten Zugriff auf Wasser und Futter. Mittels Autoklavieren wurden sowohl die Käfige mit Stroh und Nestwatte, als auch das Futter und Wasser, sterilisiert. Das Arbeiten an einem Tiermodell, die Haltung der Tiere, deren Pflege und Zucht sowie sämtliche experimentellen Verfahren wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern, gemäß den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes, durchgeführt.

2.3 Genotypisierung der Mäuse

| | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| Proteinase K (20mg/ml) | Merck, Darmstadt, D |
| Gelatine | Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D |
| KCl | Merck, Darmstadt, D |
| MgCl ₂ | Merck, Darmstadt, D |
| NP40 | Fluka/Sigma, Deisenhofen, D |
| Tris-HCl | Roth, Karlsruhe, D |
| Tween-20 | Fluka/Sigma, Deisenhofen, D |
| 10x-PE-Puffer (Thermopol Puffer) | New England BioLabs, Frankfurt, D |
| Taq-DNA-Polymerase | New England BioLabs, Frankfurt, D |
| 1,25mM dNTP | Fermentas, St.-Leon-Rot, D |
| Agarosepulver | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Ethidiumbromid (10 mg/ml) | Fluka/Sigma, Deisenhofen, D |
| Xylencyanol | Roth, Karlsruhe, D |
| Bromphenolblau | Roth, Karlsruhe, D |
| Glycerin | Roth, Karlsruhe, D |
| Borsäure | Fluka/Sigma, Deisenhofen, D |
| Tris | Roth, Karlsruhe, D |

| | |
|--------------------------|---|
| PBND-Puffer: | 2,5ml 2M KCl; 1ml 1M Tris-HCl (pH8,3); 0,25ml 1M MgCl ₂ ; 10ml 0,1% Gelatine; 0,45ml 100% NP-40; 0,45ml 100% Tween-20; auf 100 ml Wasser |
| 6x-Ladepuffer: | 3000µl 100% Glycerol; 500µl 5% Bromphenolblau; 500µl 5% Xylencyanol; 6000µl Wasser |
| Low-range-Proteinmarker: | 30µl DNA-Ladder, 15µl 6x-Ladepuffer, 60µl Wasser |
| 5x-TBE-Puffer: | 53g Tris; 27,5g Borsäure; 20ml 0,5M EDTA [pH8,0] |
| 2%-Agarose-Gel: | 2g Agarose; 100ml 1x TBE; 8µl Ethidiumbromid (10 mg/ml); aufkochen |

Mastermix für PCR (pro Probe):

| | | |
|--------|--------------------------|----------------------------|
| 2,5µl | 10x-PE-Puffer | Qiagen, Hilden, D |
| 2,0µl | 1,25mM dNTP | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| 1,0µl | Forward-Primer (10 µmol) | Metabion, München, D |
| 1,0µl | Reverse-Primer (10 pmol) | Metabion, München, D |
| 0,5µl | Taq-DNA-Polymerase | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| 17,0µl | H ₂ O | |

Verwendete Primer:

| | |
|-------------------------|-----------------------------------|
| IRF4-WT-Forward-Primer: | 5'-GCA ATG GGA AAC TCC GAC AGT-3' |
| IRF4-WT-Reverse-Primer: | 5'-CAG CGT CCT CCT CAC GAT TGT-3' |
| IRF4-KO-Forward-Primer: | 5'-CCG GTG CCC TGA ATG AAC TGC-3' |
| IRF4-KO-Reverse-Primer: | 5'-CAA TAT CAC GGG TAG CCA ACG-3' |

Die DNA der Mäuse wurde isoliert, mit Hilfe von *Polymerase Chain Reaction* (PCR) amplifiziert und schließlich mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Zunächst wurde die DNA isoliert. Hierzu wurde in einem ersten Schritt ein etwa 2mm langes Stück Schwanzspitze in ein 1,5ml-Eppendorf-Gefäß mit 200µl PBND-Puffer und 1µl Proteinase-K (20mg/ml) gegeben und unter Schütteln in einem 56°C-Thermoblock 4 Stunden lang angedaut. Sobald das Gewebe vollständiger aufgelöst war, wurde die Probe bei 13.000rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Die im Überstand gewonnene DNA wurde in ein neues 1,5ml-Gefäß pipettiert und stand jetzt zur Weiterverarbeitung bereit. Als

Nächstes wurden die verschiedenen Mastermixe für die PCR hergestellt (s. o.). Je nach hinzugefügtem Forward- und Reverse-Primerpaar unterschieden sich die Mastermixe. Ein Mastermix beinhaltet den IRF4-Primer (WT), ein weiterer Primer beinhaltet die Primer des IRF4-Knockouts (KO). Für jede einzelne DNA-Probe wurde ein Wildtyp-Mastermix und ein Knockout-Mastermix mit DNA (1µl) erstellt. Zu Kontrollzwecken wurden zusätzlich Proben mit (C57BL/6)-WT-DNA, heterozygote IRF4-knockout-DNA und homozygote IRF4-knockout-DNA angesetzt. Daneben wurde und Proben mit H₂O (anstatt DNA) angesetzt. Im Anschluss konnte mithilfe der PCR-Maschine in 30 Zyklen die DNA der Proben amplifiziert werden. Um die bestmögliche Denaturierung der DNA und der Primer zu gewährleisten, wurde vor dem Start der Zyklen eine 15-minütige Präinkubation bei 94°C durchgeführt. Jeder Zyklus begann mit einer 30-sekündigen Denaturierungsphase bei 94°C. Darauf folgte die Phase der Primer-Hybridisierung: 60 Sekunden bei 61°C. Der Zyklus endete jeweils mit der DNA-Synthese. Diese dauerte 90 Sekunden und wurde bei 72°C durchgeführt. Nachdem die 30 Zyklen beendet wurden, inkubierten wir die Proben für weitere 10 Minuten bei 72°C. Hierbei kam es zu einer Hybridisierung der Einzelstränge der DNA. Damit war PCR beendet. Die Proben wurden daraufhin bei 4°C gelagert. Im Anschluss daran wurde ein 2 prozentiges Agarosegel erstellt: 2g Agarosepulver wurden mit 100ml TBE-Puffer verrührt. Diese Mischung wurde aufgekocht und 8µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) dazu gegeben. Nun wurden die Proben mit 4µl 6x-Ladepuffer vermischt und jeweils 8-10µl auf das Agarosegel aufgetragen. Als Kontrollprobe wurde jeweils ein low-range-Proteinmarker mit DNA-Fragmenten bekannter Längen in die erste Vertiefung gegeben. Nun wurden die Proben für 15-32 Minuten bei 200V inkubiert. Als letzter Schritt wurden die Banden schließlich durch Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar. Vergleicht man nun die beiden Mastermix-Reihen, so kann man heterozygote von homozygoten Genotypen unterscheiden. Mit diesem Verfahren konnten wir die Tiere jeweils dem IFR4-Wildtyp- oder dem IRF4-Knockouttyp zuordnen.

2.4 Induktion einer transienten renalen Ischämie und Reperfusion

| | |
|---|---------------------------|
| 1 Yasargil Aneurysma Clip Standard permanent; closing force: 181,4 g/1,78 N | Medicon eG, Tuttlingen, D |
| isotone NaCl-Lösung 0,9% | Brown, Weinheim, D |
| Bepanthen Augen- und Nasensalbe 5g, | Bayer, Berlin, D |

| | |
|---|---|
| 5% | |
| BD Plastipak™ 1 ml Spritzen | Becton Dickinson S.A., Madrid, E |
| BD Microlance™ 26G Injektionsnadel | Becton Dickinson S.A., Madrid, E |
| Vicryl, Polyglactin 910, PS-2 19 mm resorbierbares chirurgisches Nahtmaterial | Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, D |
| Anatomische Pinzette | Medicon eG, Tuttlingen, D |
| Nadelhalter | Medicon eG, Tuttlingen, D |
| Präparierschere | Medicon eG, Tuttlingen, D |
| Präparerpinzette | Medicon eG, Tuttlingen, D |
| Skalpell | Pfm medical ag, Köln, D |
| Sterile Multikompressen 5x5 cm | NOBA Verbandmittel, Wetter, D |
| Temperature control unit HB101/2 | Panlab Bioresearch, Barcelona, ES |
| Vicryl, Polyglactin 910, PS-2 19 mm | Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, D |
| UV-Licht | Bachhofer Laborgeräte, Reutlingen, D |
| Yasargil clip applying Forceps | Medicon eG, Tuttlingen, D |
| 100 Series Vaporizer for Forene | Smiths Medical PM, Inc., Norwell, USA |
| Forene 100% Isofloran | Abbott, Baar, CH |

Ansatz Narkosemix

| | | |
|------|---|-------------------------|
| 10ml | 5mg/ml Midazolam (<i>Midazolamhydrochlorid</i>) | Ratiopharm GmbH, Ulm, D |
| 2ml | 0,05mg/ml Fentanyl Janssen (<i>Fentanylcitrat</i>) | Janssen-Cilag, Neuss, D |
| 1ml | 1mg/ml Dorbene vet. (<i>Medetomidinhydrochlorid</i>) | Pfizer GmbH, Berlin, D |

Ansatz Antagonistenmix

| | | |
|-------|---|---------------------------------------|
| 5ml | Flumazil Hikma 0,1mg/ml (<i>Flumazil</i>) | Hikma Pharma, Nieder-Olm, D |
| 3ml | 0,4mg/ml Naloxon (<i>Naloxonhydrochlorid</i>) | Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, D |
| 0,5ml | 5mg/ml Revertor | CP-Pharma GmbH, Burgdorf, D |

Die operativ induzierte renale Ischämie mit anschließender Reperfusion stellt, als Modell des akuten Nierenversagens, den Mittelpunkt dieser Studie dar. Das Prinzip der Operation besteht in dem uni- bzw. bilateralem Abklemmen der Nierengefäße von IFR4-knockout und C57-B1/6-Wildtyp-Mäusen. Die Versuchstiere waren weiblich und 6 bis 8 Wochen alt. Bei unilateralem Abklemmen der Nierengefäße dient die kontralaterale Niere als intra-individuelle Kontrolle. Zur Narkoseinduktion wurde ein Gemisch aus einem Benzodiazepin zur Muskelrelaxation und Sedierung, einem Derivat der Barbitursäure zur Hypnose und einem Opiat zur Analgesie injiziert. Ausgeleitet wurde die Narkose mit einer Antagonistenmischung. Je nach Gewicht des Tieres wurde eine bestimmte Dosis der Narkoselösung verabreicht. Pro kg Körpergewicht wurden dabei 0,5mg Dornobene, 5mg Midazolam und 0,05mg Fentanyl appliziert. Sowohl die Narkosemischung, als auch der Antagonistenmix, wurden intraperitoneal in den unteren rechten Quadranten in Richtung Bauchmitte in einem Winkel von 30-45° injiziert. Nach einem Zeitintervall von mindestens 10 Minuten wurde von einer suffizienten Analgosedierung und ausreichenden Muskelrelaxation für chirurgische Interventionen von bis zu einer Stunde ausgegangen. Während der gesamten Prozedur wurden die Tiere kontinuierlich mit einer 60-Watt-Infrarot-Wärmelampe bestrahlt und lagen auf einer 39°C-warmen Wärmeunterlage. Damit konnte die Körpertemperatur der Versuchstiere konstant zwischen 35 und 37°C gehalten werden. Die Körpertemperatur der Maus wurde überwacht und auf ihrem Ausgangswert, vor Beginn der chirurgischen Intervention, gehalten. Um intraoperativen Bindehaut- und Hornhautschäden vorzubeugen, wurden die Tiere nach Einleitung der Narkose mit *Bepanthen*-Augensalbe versorgt. Als Nächstes wurden die Mäuse an allen Extremitäten mit Hilfe von Klebestreifen an der auf 39°C-vorgewärmten Operationsunterlage fixiert. Anschließend wurde das Operationsgebiet mit Ethanol desinfiziert. Daraufhin wurden die Haare über der Inzisionsstelle im Bereich der Flanken mit steriler Flüssigkeit auseinander gestrichen und es erfolgte ein 1cm-langer, unilateraler Flankenschnitt. Nach Eröffnung der Körperhöhle sowie Separation des subkutanen Raumes und der Muskulatur wurde die Niere im Operationssitus dargestellt. Mithilfe einer kleinen Pinzette wurde hierfür die Niere behutsam aus dem Nierenlager im Retroperitonealraum luxiert. Im Anschluss erfolgte die Freilegung des Hilums renale und dessen Abklemmung mit Hilfe einer Mikroaneurysmaklemme. Durch die vollständige Isolation der Niere von der Perfusion war hiermit die totale renale Ischämie erreicht. Um Wärmeverlust und Austrocknung zu vermeiden, befanden sich die Nieren während der gesamten Phase der Gefäßabklemmung, mit einem mit NaCl-befeuchteten Tupfer bedeckt, in der Bauchhöhle. Nach einer totalen Ischämiezeit von 45 Minuten wurde die mikrovaskuläre Klemme entfernt und damit die arterielle Versorgung wiederhergestellt. Im Anschluss wurde die

Niere wieder zurück in das Nierenlager reponiert und drei Tropfen isotone Kochsalzlösung in die Bauchhöhle getropft, um eventuelle Flüssigkeitsverluste auszugleichen. Es folgte die Wundnaht mit sterilem Nahtmaterial. Hierfür wurden das Peritoneum und die Haut mit Einzelknopfnähten mit 2 bis 3 Stichen vernäht. Die Gesamtdauer der chirurgischen Intervention lag bei circa 60 Minuten. Als letzter Schritt erfolgte eine Injektion von 200µl des Anatagonistenmixes, einer Mischung aus Opioid-Antagonist, Benzodiazepin-Antagonist und Alpha-2-Antagonist. Nach Beendigung der Operation wurden die Tiere für weitere 120 Minuten unter einer Infrarot-Wärmelampe vor Unterkühlung geschützt.

2.5 Behandlung der Mäuse mit Clodronat-Liposomen vor Ischämie-Reperfusion

| | |
|-----------------------------------|--|
| Cl ₂ MDP (Clodronat) | Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland |
| Kontroll-Liposomen | Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland |
| [2,5g/10ml wässrige Lösung (PBS)] | |

Clodronat wurde uns von Roche Diagnostics überlassen. Als Bisphosphonat wird es in der Humanmedizin als Anti-Osteoporotikum bei osteolytischen Knochenerkrankungen eingesetzt. Als hydrophiles Molekül kann Clodronat nicht die Lipiddoppelschicht der Zell- und Liposomenmembranen passieren, weshalb es in Liposomen verpackt wird. Somit kann es von phagozytierenden Zellen, wie Makrophagen, Osteoklasten etc. aufgenommen werden. Nach Endozytose durch phagozytierende Zellen folgt die Zerstörung der Lipidmembranen durch Phospholipasen. Somit liegt Clodronat frei in den Phagozyten vor. Es akkumuliert und bei Überschreiten eines Grenzwertes wird die Apoptose des Phagozyten indiziert. Das nun freiwerdende Clodronat hat eine 15-minütige Halbwertszeit und wird rasch über die Niere ausgeschieden [115]. In uni- und bilateralen Versuchsreihen wurden IRF4-defiziente-Mäuse und Wildtyp-Mäuse mit Clodronat behandelt. Hierdurch werden v. a. Makrophagen eliminiert. Zwei Tage vor der geplanten IRI wurde den Versuchstieren Kontroll-Liposomen oder Clodronat-Liposomen intravenös verabreicht [116].

2.6 Nierenentnahme nach Ischämie-Reperfusionsooperation

Nach einer postoperativen Rehabilitationszeit von 35 Tagen wurden die Versuchstiere mittels zervikaler Dislokation getötet. Im Anschluss erfolgte die mediane Laparotomie, um einen Zugang zu den Ischämienieren und den unbehandelten nicht-operierten Kontrollnieren zu gewinnen. Nach Entnahme der Nieren wurden zunächst die Nierenkapseln entfernt. In einem nächsten Schritt wurden die Nieren in drei Querteile geteilt. Zur weiteren RNA-Bestimmung wurde der obere Nierenpol in 600µl RNAlater eingebettet und auf Eis gekühlt bzw. bei -20°C gelagert. Das mittlere Nierendrittel, den Nierenhilus mitinbegriffen, wurde für die histomorphologische Aufarbeitung in Formalinlösung (10-prozentig) eingebettet. Mit Hilfe von Stickstoff wurde der verbleibende Nierenpol bei -80°C gelagert. Pro Gruppe wurden 8 bis 10 Tiere untersucht.

Zur Untersuchung der systemischen Zytokinspiegel und der Rolle von IRF4 bei der Entwicklung von T-Zellen zu untersuchen, wurden Einzelkohorten sowohl der IRF4-knockout Mäuse als auch der Wildtypmäuse mit LPS (1mg/kg) injiziert. 12 Stunden nach Injektion wurden die Nieren entnommen und untersucht.

2.7 Blutentnahme und Bestimmung von Kreatinin und Harnstoff im Serum

| | |
|-----------|----------------------|
| Isofluran | Abbott, Wiesbaden, D |
|-----------|----------------------|

Nach erfolgter Narkotisierung der Versuchstiere mit Isofluran-Gas wurde mittels Mikropipette Blut aus der Vena angularis abgenommen. Anschließend wurden die Blutproben für vier Stunden bei 4°C gelagert. Als Nächstes wurden die Proben für fünf Minuten bei 6000rpm zentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde abpipettiert. Für die Harnstoff- und Kreatininbestimmung wurden pro Versuchstier 200µl Serum gewonnen. Die Serumproben wurden gekühlt. Die Lagerung der Proben fand im Laboratorium „Synlab.vet“ (www.synlab.de) ausgewertet.

2.8 Gewinnung der RNA und Umschreiben in cDNA

2.8.1 Isolierung der RNA aus Nierengewebe

| | |
|--|---|
| 0,1M DTT | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| 15g/ml lineares Acrylamide | Ambion, Darmstadt, D |
| 100mM dNTP Set | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| 25mM dNTPS | Fermentas, St.-Leon-Rot, D |
| 40 U/l rRNasin | Promega, Mannheim, D |
| 5*First strand Buffer | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Agarosepulver | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| β -Mercaptoethanol | Roth, Karlsruhe, D |
| Diethyl-Pyrocbonat | Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D |
| DNase Set (enthält DNase, RDD-Puffer und RNase freies Wasser) | Qiagen, Hilden, D |
| Hexanucleotide | Roche, Mannheim, D |
| RNA-sample-loading-Buffer (incl. Ehtidiumbromid) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D |
| PureLink [®] RNA Mini Kit (enthält Lyse-Puffer; Wasch-Puffer I und II; RNase-free water; 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen, Sammelröhrchen, Isolationssäulen) | Ambion [®] Life Technologies GmbH Darmstadt, D |
| Superscript II (reverse Transkriptase) | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Reaktionsgefäße mit Deckel (Eppendorf-Röhrchen) | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| Ultra-TURRAX-T25-Homogenisator | Ika-Werke, Staufen, D |
| Eppendorf Zentrifuge 5418 | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| Ethanol | MerckKGaA, Darmstadt, D |
| 2-mercapto-ethanol | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D |
| Vortex Genie 2 TM | Scientific Industries, N.Y., USA |
| Handschuhe Reha-soft [®] satin | Hartmann, Heidenheim, D |
| Pipetten Pipetman [®] | Gilson, Middleton, WI, USA |

| | |
|--|---|
| RNase Free | Gene choice, Pelican life science, USA |
| Pipettenspitzen 1-1 000µl Typ Gilson® | Peske, Aindling-Arnhofen, D |
| NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| Lightcycler® 480 RT-PCR System | Roche, Mannheim, D |
| 96 well Lightcycler Platte, Klebefolie | Sarstedt, Nürmbrach-Rommelsdorf, D |
| Megafuge 1.0 R | Heraeus Holding GmbH, Hanau, D |
| Sartorius-Waage BP110S | Sartorius AG, Göttingen, D |

| | |
|-----------------|---|
| 5x-TBE-Puffer: | 53g Tris, 27,5g Borsäure, 20ml von 0,5M EDTA [pH8,0] |
| 2%-Agarose-Gel: | 2g Agarose-Pulver + 100ml 1xTBE-Puffer 1g Agarose-Pulver + 50ml 1xTBE-Puffer |

2.8.2 RNA-Isolation mittels RNA Mini Kit

Während der gesamten Arbeiten zur Isolierung der RNA wurde auf Eis gearbeitet. Als erster Schritt in der RNA-Gewinnung wurde die Arbeitsfläche mit RNase free water und Alkohol gereinigt. Daneben wurden die Eppendorf-Gefäße mit Diethyl-Pyrocbonat behandelt. Zum einen wurden sterile 1,5ml Eppendorf-Röhrchen für das Auffangen der aufgereinigten RNA vorbereitet. Hierfür wurden die Eppendorf-Gefäße mit 350µl 70 %igem Alkohol befüllt und mit beschrifteten Etiketten versehen. Des Weiteren wurden sterile 2ml Reaktionsgefäße mit Etiketten versehen und mit 600µl Lyse-Puffer und β-Mercaptoethanol in einem Verhältnis von 1:100 befüllt.

Die Nierengewebeproben der Versuchstiere wurden nach Entnahme in Eppendorfgefäße mit jeweils 600µl RNAlater gegeben und bei -20°C aufbewahrt. Mithilfe der Sartorius-Waage wurden etwa 30mg Kortexgewebe für die RNA-Isolierung abgewogen, mit Hilfe eines Skalpells zerkleinert und zügig in ein Eppendorf-Röhrchen mit RLT-Lyse-Puffer gelegt (gemischt mit 1 %-β-Mercaptoethanol). Anschließend wurde das Gewebe für eine halbe Minute bei 17.500rpm lysiert und homogenisiert.

Im nächsten Schritt wurden die Proben für 210 Sekunden bei 10 000rpm zentrifugiert und 350µl des Überstands in die mit Ethanol gefüllten Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Der Rest wurde verworfen.

Anschließend wurde das Gemisch aus Überstand und Ethanol für 60 Sekunden auf der höchsten Stufe des Vortexers gemischt und die Probe auf die Säulen des RNA-Kits gegeben. Die Proben wurden daraufhin für 15 Sekunden bei 10 000rpm zentrifugiert und das Filtrat wurde verworfen. Als Nächstes wurde Wash Buffer 1 (700µl) auf die Probe pipettiert. Im Anschluss wurde das Gemisch erneut für 15 Sekunden bei 10 000rpm zentrifugiert. Nach einem Wechsel der Handschuhe wurden die Proben in neue Gefäße pipettiert. In einem nächsten Schritt wurden die Säulen mit 500µl Wash Buffer 2 vermischt. Es folgte eine erneute 15-minütige Zentrifugation und bei 10 000rpm.

Anschließend wurde wiederholt das Filtrat verworfen, der Säule wurden 500µl des Waschpuffers 2 zugesetzt und die Mixtur wurde für 2 Minuten bei 10 000rpm zentrifugiert. Abschließend wurde das Recoverytube entleert und die Säule für 60 Sekunden bei 14 000rpm zentrifugiert. Die so gewonnene Säule wurde nun in das beschriftete, sterile Eppendorff-Gefäß pipettiert und nach Zugabe von 33µl RNase freiem Wasser wurde für 120 Sekunden gewartet. Damit war die RNA isoliert. Durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 10 000rpm wurde die RNA in den Boden des Eppendorff-Gefäßes gedrückt und bei -20°C eingefroren.

2.8.3 Bestimmung der optischen Dichte und Messung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentration an RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop Spektrophotometers. Hierbei wird die optische Dichte bestimmt. Zunächst erfolgte die Eichung des Spektrophotometer auf den Nullwert mit 3µl RNase freiem Wasser. Der Spektrophotometer wurde zuerst auf die Wellenlängen 260nm und 280nm eingestellt. In einem nächsten Schritt konnte der Reinheitsgrad der RNA durch das 260/280-Verhältnis ermittelt werden. Hierfür wurden je 3µl der Probe auf den Sensor des Photometers pipettiert und vermessen. Ein hoher Reinheitsgrad der RNA war geboten bei Werten zwischen 1,7 und 2,2. War der Wert höher, konnte von DNA-Verunreinigungen ausgegangen werden. Zu niedrige Werte resultieren aus der Kontamination mit Proteinen. Die RNA-Proben wurden anschließend auf Eis gelagert.

Die RNA-Konzentration wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$c(\text{g/ml}) = \text{Extension bei 260nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1 \text{ optische Dichte (für RNA 40}\mu\text{g/ml)}$$

Neben der photometrischen Ermittlung der Reinheit der RNA gibt es auch die Möglichkeit der Bestimmung der RNA-Reinheit durch die Gel-Elektrophorese. Für dieses Verfahren werden 2µl

der RNA mit 5µl RNA-Ladepuffer inkubiert. Dieser Ladepuffer beinhaltet Ethidiumbromid. Die Inkubation verlief im Thermomixer (10 Minuten, 37°C). Dieses Gemisch wurde anschließend auf Agarose-Gel (2-prozentig) pipettiert. Danach wurde die Banden bei 130V für 20 Minuten laufen gelassen. Zuletzt wurden sie im Dunkeln mit Hilfe von UV-Licht abfotografiert und der Grad der Reinheit anhand des Abgrenzbarkeit der Banden bestimmt. Waren die Banden nicht verwischt und deutlich zu sehen, konnte von einer adäquaten Reinheit ausgegangen werden.

2.8.4 Umschreibung der mRNA in cDNA

cDNA Mastermix für 1 Probe

| | | |
|---------|---|--|
| 1µl | 0,1 M DTT | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| 0,215µl | Hexanucleotide Mischung, 10x Konzentriert (Primer) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D |
| 4µl | 5x First Strand Buffer | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| 0,25µl | 5 g/ml linear Acrylamide | Ambion, Darmstadt, D |
| 0,4µl | 25 mM dNTPs | Fermentas, St.-Leon-Rot, D |
| 0,5µl | 40 U/µl rRNasin | Promega, Mannheim, D |
| 0,435µl | Superscript II (Reverse Transkriptase) | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| 8µl | RNase-freies Wasser | |

2.8.5 c-DNA Herstellung

Die c-DNA-Herstellung beruht auf der enzymatischen Synthese mithilfe der Reversen Transkriptase. Dieses Enzym synthetisiert aus mRNA eine komplementäre c-DNA. Vor Beginn der eigentlichen c-DNA Synthese wurden je ein Thermomixer auf die Temperaturen 42°C und 65°C vorgeheizt, die RNA-Proben und die benötigten Reagenzien mit Ausnahme der Enzyme schonend aufgetaut und sterile 1,5ml Eppendorf-Gefäße beschriftet.

Während der Synthese von c-DNA wurde mit zwei unterschiedlichen Mastermixen gearbeitet: Der Mastermix mit Reverser Transkriptase, RT(+)-Mix, und der Mastermix ohne Reverser Transkriptase, RT(-)-Mix. Für die Probe wurden Acrylamid, DTT, First-Strand-Buffer, dNTPs, RNase-freies Wasser und der Primer gemischt. Zusätzlich wurde unmittelbar vor Beginn der

enzymatischen Reaktion in den RT(+)-Mix RNasin und Superscript II vermischt. Für die Proben des RT(-)-Mixes wurden, anstatt Superscript II, RNase-freies Wasser hinzugefügt. Der initiale Schritt in der Verarbeitung der RNA war die Verdünnung der RNA auf 1µg/5µl H₂O und die darauffolgende 5-minütige Inkubation bei 65°C im Thermomix. Die RNA konnte sich hierdurch vollständig entfalten. Eine bessere Reaktionsfähigkeit mit der Reversen Transkriptase war gegeben. Als Nächstes wurden die RNA-Proben für eine kurze Dauer auf Eis gekühlt und schließlich der Mastermix hinzugefügt. Für jede RNA-Probe wurden jeweils eine Mastermix-Reihe mit Reverser Transkriptase und eine Kontrollreihe ohne Reverser Transkriptase hergestellt. Das RT(-)-Reagenz dient als Kontrolle für eine etwaige DNA-Kontamination. Ist hier cDNA nachweisbar, so spricht dies für eine Verunreinigung der Probe. Als letzter Schritt wurde mittels Inkubation der gesamten Mixtur, für 90 Minuten bei 42°C, die eigentliche Reaktion gestartet. Durch Inkubation für 5 Minuten bei 85°C wurde die Reaktion dann schließlich beendet und die cDNA tiefgefroren (-20°C).

2.8.6 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (LightCycler 480)

Mit der quantitativen *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) lassen sich selbst kleinste Mengen von DNA nachweisen. Hierfür werden Nukleinsäuren zunächst vervielfältigt. Im Anschluss werden diese mit Hilfe von fluoreszierenden Signalen quantitativ analysiert. SybrGreen I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an die doppelsträngige DNA bindet. So erhöht er sein Fluoreszenz-Signal. Dieses Signal wird nach Abschluss jedes Elongationszykluses bestimmt und nimmt proportional zur Anzahl der synthetisierten PCR Produkte zu. Die Polymerase-Kettenreaktion selbst setzt sich aus drei aufeinanderfolgenden Schritten zusammen: Der Denaturierung, dem Primeranlagerung (*Annealing*) und dem Polymerisationsvorgang (Elongation). Diese Arbeitsschritte werden kontinuierlich wiederholt, sodass die Zielsequenz nach 45 Zyklen exponentiell amplifiziert ist. Die erste Phase beschreibt den Schritt der Denaturierung. Hier wird die DNA zunächst auf 95°C erhitzt, wodurch die DNA-Doppelhelix in zwei komplementäre Einzelstränge geteilt wird. Darauf folgend kommt es im zweiten Arbeitsschritt, dem *Annealing*, zur Anlagerung des zugegebenen Primers an die komplementäre DNA-Sequenz des Einzelstranges. Diese Primer-Sequenz dient nun als Ausgangspunkt für die Elongation. Die optimale Annealing-Temperatur liegt in etwa zwischen 45 und 65°C und ist von der Zusammensetzung der Basen sowie der Primerlänge abhängig. Daher müssen die Konditionen für

jedes Primerpaar individuell angepasst werden. In der dritten Phase findet die Elongation mit Hilfe der hitzestabilen DNA-Polymerase statt. Durch Anlagerung von dNTPs (dCTP, dATP, dTTP und dGTP) wird die Primer-Sequenz, beginnend am 3'-OH-Ende des Primers verlängert und damit der neue Strang komplementär zur Matrize, synthetisiert.

Mit Hilfe der Fluoreszenzmessung wird für jedes Reagenz die Anzahl der Zyklen festgelegt, die durchzuführen sind, damit die jeweilige Probe sich von Fluoreszenzhintergrundsignalen abhebt. Sobald das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal den Wert der Hintergrundfluoreszenz übersteigt, spricht man vom Cycle Threshold (CT-Wert). Mit der Bestimmung des CT-Wertes können Rückschlüsse auf die Quantität des Ausgangssubstrats gezogen werden. Wenn ursprünglich mehr mRNA, und damit mehr cDNA, vorliegt, sind weniger Zyklen erforderlich, um ein signifikantes Fluoreszenz-Signal durch Vervielfältigung der DNA-Sequenz zu messen. Entsprechend der sog. „ $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode für die relative Quantifizierung“ wurden Proben, bei denen ein CT-Wert gleich oder größer als 35 ermittelt wurde, als nicht nachweisbar angesehen. Um etwaige Abwandlungen auszugleichen vergleichen wir den gemessenen CT-Wert mit dem CT-Wert des Housekeeping-Gens 18s vergleichen. 18s rRNA ist eine endogene Referenz, die in allen Proben in gleichem Maß enthalten ist. Durch die Zugabe dieses Housekeeping-Gens wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt.

Der Umfang der Expression der jeweiligen DNA-Sequenz lässt sich durch das Verhältnis zwischen Ziel- und Referenzsequenz bestimmen. Zum Ausschluss von Verunreinigungen im PCR-Mastermix wurden die Proben mit Negativkontrolle verglichen. Als Negativkontrolle wurde zweifach-destilliertes Wasser gewählt, bei dem sowohl das Zielgen, als auch die *housekeeper genes* nicht nachweisbar waren. Die gesamte qRT-PCR wurde mit dem LightCycler 480 sowie dem SybrGreen-Detektions-System durchgeführt und entsprechend den MIQUE-Richtlinien umgesetzt [117].

Protokoll

2x-SybrGreen-Mastermix (10ml)

| | | |
|-------|----------------------------------|-------------------------------|
| 2ml | 10x-Taq-Puffer ohne Detergenzien | Fermentas, St.-Leon-Rot, D |
| 150µl | dNTPs (25 mM) | Fermentas, St.-Leon-Rot, D |
| 4ml | PCR-Optimizer | Bitop AG, Witten, Deutschland |

| | | |
|--------|------------------------------------|----------------------------------|
| 200µl | BSA PCR grade (20 mg/ml) | Fermentas, St.-Leon-Rot, D |
| 40µl | 40µl SybrGreen I (1:100; 20% DMSO) | Fluka/ Sigma-Aldrich, München, D |
| 2,4ml | MgCl ₂ (25 mM) | Fermentas, St.-Leon-Rot, D |
| 1210µl | RNAse-freies Wasser | |

PCR-Mix pro Vertiefung:

| | |
|---|--|
| 10µl 2x-SybrGreen-Mastermix | |
| 0,6µl Reverse-Primer (300 nM) | Metabion, Martinsried, D |
| 0,6µl Forward-Primer (300 nM) | Metabion, Martinsried, D |
| 0,16µl Taq-Polymerase | New England BioLabs, Frankfurt a.M., D |
| 8,4µl RNAse-freies Wasser | |
| 0,2µl „cDNA“: RT(+), RT(-) oder RNAse-freies Wasser (NTC) | |

Verwendete Primer:

| | | |
|------------|-----------------|----------------------------|
| 18s-rRNA | Forward-Primer: | 5' GCAATTATTCCCCATGAACG 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' AGGGCCTCACTAAACCATCC 3' |
| Arginase 1 | Forward-Primer: | 5' AGAGATTATCGGAGCGCCTT 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' TTTTTCAGCAGACCAGCTT 3' |
| IFN-γ | Forward-Primer: | 5' ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' TGA CTCATTGAATGCTTGG 3' |
| IRF4 | Forward-Primer: | 5' CAAAGCACAGAGTCACCTGG 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' TGCAAGCTCTTTGACACACA 3' |
| CCL2/MCP1 | Forward-Primer: | 5' CCTGCTGTTACAGTTGCC 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' ATTGGGATCATCTTGCTGGT 3' |
| CXCL2/MIP2 | Forward-Primer: | 5' CGGTCAAAAAGTTGCCTTG 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' TCCAGGTCAGTTAGCCTTGC 3' |
| FSP1 | Forward-Primer: | 5' CAGCACTTCCTCTCTCTTGG 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' TTTGTGGAAGGTGGACACAA 3' |
| iNOS | Forward-Primer: | 5' TTCTGTGCTGTCCCAGTGAG 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' TGAAGAAAACCCCTTGTGCT 3' |

| | | |
|---------------|-----------------|------------------------------|
| IL4 | Forward-Primer: | 5' ATGGATGTGCCAAACGTCCT 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' AGCTTATCGATGAATCCAGGCA 3' |
| IL6 | Forward-Primer: | 5' TGATGCACTTGCAGAAAACA 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' ACCAGAGGAAATTTTCAATAGG 3' |
| IL10 | Forward-Primer: | 5' ATCGATTTCTCCCCTGTGAA 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' TGTCAAATTCATTCATGGCCT 3' |
| IL12 | Forward-Primer: | 5' CTAGACAAGGGCATGCTGGT 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' GCTTCTCCCACAGGAGGTTT 3' |
| TNF- α | Forward-Primer: | 5' CCACCACGCTCTTCTGTCTAC 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' AGGGTCTGGGCCATAGAACT 3' |
| TGF- β | Forward-Primer: | 5' GGAGAGCCCTGGATACCAAC 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' CAACCCAGGTCCTTCCTAAA 3' |
| Ccr2 | Forward-Primer: | 5'AGGCATCCATTTTGCTTCTG 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' CAACTCCTTCATCAGGCACA 3' |
| Collagen 1a1 | Forward-Primer: | 5' ACATGTTTCTGCTTTGTGGACC 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' TAGGCCATTGTGTATGCAGC 3' |
| Collagen 4a1 | Forward-Primer: | 5' GTCTGGCTTCTGCTGCTCTT 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' CACATTTTCCACAGCCAGAG 3' |
| CTGF | Forward-Primer: | 5' AGCTGACCTGGAGGAAAACA 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' CCGCAGAACTTAGCCCTGTA 3' |
| E-Cadherin | Forward-Primer: | 5' GAGGTCTACACCTTCCCGGT 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' CCACTTTGAATCGGGAGTCT 3' |
| Fibronectin | Forward-Primer: | 5' GGAGTGGCACTGTCAACCTC 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' ACTGGATGGGGTGGGAAT 3' |
| Fizz1/Retnla | Forward-Primer: | 5' TGGGATGACTGCTACTGGGT 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' AACGAGTAAGCACAGGCAGT 3' |
| Kim-1 | Forward-Primer: | 5' TGGCACTGTGACATCCTCAGA 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' GCAACGGACATGCCAACATA 3' |
| Mmp2 | Forward-Primer: | 5' CAAGGATGGACTCCTGGCACAT 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' TACTCGCCATCAGCGTTCCCAT 3' |
| Mmp9 | Forward-Primer: | 5' GCTGACTACGATAAGGACGGCA 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' TAGTGGTGCAGGCAGAGTAGGA 3' |
| NGAL | Forward-Primer: | 5' ATTTCCCAGAGTGAAGTGGC 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' AATGRCACCTCCATCCTGGT 3' |
| Ocln | Forward-Primer: | 5' TGGCAAGCGATCATACCCAGAG 3' |

| | | |
|-----------|-----------------|-------------------------------|
| | Reverse-Primer: | 5' CTGCCTGAAGTCATCCACACTC 3' |
| Pcna | Forward-Primer: | 5' TGGATAAAGAAGAGGAGGCG 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' GGAGACAGTGGAGTGGCTTT 3' |
| Vim | Forward-Primer: | 5' AAAGCACCTGCAGTCATTC 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' GCTCCTGGATGTGTTCATCG 3' |
| Ym1/Chil3 | Forward-Primer: | 5' AGAAGCAATCCTGAAGACACCAT 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' TTCTATTGGCCTGTCCTTAGCC 3' |
| Zo1/Tjp1 | Forward-Primer: | 5' GTTGGTACGGTGCCCTGAAAGA 3' |
| | Reverse-Primer: | 5' GCTGACAGGTAGGACAGACGAT 3' |

Vor Beginn der eigentlichen qRT-PCR wurden der Mastermix und der PCR-Mix hergestellt. Hierbei wurden für jedes Gen spezifische Primersequenzen verwendet und die 18s-rRNA als Referenz-Gen getestet. Mit Hilfe des BLAST (www.ensembl.org) konnte die Spezifität der Primer überprüft werden. Zu 0,2µl cDNA wurden je 8,44µl RNase freies Wasser gegeben. Im Anschluss wurde diese Verdünnung auf die 96-well Platte pipettiert. In jede Vertiefung wurde zusätzlich 11,4µl des PCR-Mastermix hinzugegeben. Es wurden je Probe eine RT(-)-Probe und eine NTC-Probe (Negativkontrolle mit Wasser) und je zwei RT(+)-Proben aufgetragen. Mit Hilfe der RT(-)- und NTC-Proben konnten unspezifische DNA-Amplifikationen erkannt werden. Dadurch konnte die Testvalidität kontrolliert werden. Die Platte wurde, sobald alle Proben aufgetragen waren mit einer durchsichtigen Folie verschlossen und zentrifugiert. Anschließend wurde die PCR im Lightcycler durchgeführt. Dies dauerte pro Platte 1 Stunde und 15 Minuten. Um die Taq-Polymerase zu aktivieren und um eine bestmögliche Denaturierung von Primer und DNA zu gewährleisten, wurden die Proben, im Rahmen der Initialisierung, vor jedem Zyklus zunächst für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach dieser Phase der Vor-Inkubation fand eine 45-minütige Abkühlung der Proben auf 60°C statt. Damit kam es zum Anlagern der Primer. Im nächsten Schritt wurden die Proben wieder erhitzt (15 Minuten bei 95°C). Hierbei wurde die DNA weiter amplifiziert und bei Erreichen der 95°C, erfolgte die erneute Denaturierung der Doppelstrang-DNA. Somit konnte ein weiterer Zyklus begonnen werden. Insgesamt dauerte die Vervielfältigung der DNA 40 Zyklen. Bei jedem Zyklus wurde eine Echtzeit-Messung bei 60°C durchgeführt. Nachdem die 40 Zyklen der PCR erfolgt waren, wurden die Proben auf 95°C (5 Minuten) erwärmt. Anschließend fand eine Abkühlung der Proben auf 65°C statt. Danach wurden die Proben wieder auf 95°C erwärmt. Hiermit wurde die Schmelzeigenschaft der Primer, die sog. Schmelzkurve (melting curve), geprüft. Nach Abschluss der Messungen wurden die Proben wieder

auf 4°C gekühlt. Um Fehler während der qRT-PCR zu erkennen (unspezifische DNA-Produkte oder Primer-Dimere), wurden vor der Auswertung der (RT+)-Werte die (RT-)-, die NTC-Werte und das Profil der Schmelzkurven bestimmt. Im letzten Schritt erfolgte die Trennung der Wildtyp- und Knockout-Werte. Hierfür wurden aus den 18s-rRNA-Werte Durchschnittswerte gebildet und diese von den Gen-Werten der anderen Proben abgezogen. Im Anschluss wurden die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

2.9 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen im Brutschrank bei konstant 37°C und einem Kohlenstoffdioxidgehalt der Luft von 5%. Die Arbeitsbank wurde vor Arbeitsbeginn mit UV-Licht bestrahlt und das Arbeitsmaterial wurde vor Gebrauch desinfiziert bzw. autoklaviert.

2.9.1 Isolation von Monozyten aus der Milz

Die explantierte Milz wurde zügig nach Entnahme in eine Petri-Schale mit ca. 3ml kaltem Medium (RPMI, 10 % FCS, 1 % PS) gegeben. Daraufhin wurden die Milzen mit einem weiteren Medium durch einen 70µm-Präseparationsfilter in ein Falcon gepresst und im Anschluss zentrifugiert (6 Minuten, 1600rpm, 4 °C). Im Anschluss wurde der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde mit NH₄CL (0,3 M; 4ml) resuspendiert. Daraufhin erfolgte eine Inkubation für fünf Minuten bei circa 22°C. In diesem Schritt erfolgten die Lyse der Erythrozyten und deren Entfernung aus der Suspension. Im Anschluss wurde die Probe erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss verworfen. Es folgte eine erneute Zentrifugation nach Resuspension des Niederschlags mit PBS. Damit wurde das NH₄CL ausgewaschen. Als Nächstes folgte eine Resuspension mit 3ml RPMI-Medium. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Zählkammer mikroskopisch ausgezählt. 5*10⁶ Zellen wurden auf eine 6-well-Platte aufgetragen. Daraufhin wurden den Zählkammern 3ml Medium zugegeben. Bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Zellen im Anschluss im Zellinkubator (Heraeus, Osterode, Deutschland) drei Tage lang angezüchtet. Einmal pro Tag wurde das Medium erneuert. Alle Freischwimmenden wurden somit entfernt. Die auf der Platte adhärenen Zellen waren Monozyten bzw. Makrophagen. Diese und konnten nun für die weiteren Versuche verwendet werden.

2.9.2 Isolation von murinen Tubuluszellen

Vor dem eigentlichen Versuchsbeginn wurden 6-well-Platten zur Beschichtung für 4 Stunden mit $6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in PBS gelöstem Kollagen, inkubiert. Nach Tötung der Wildtyp-Mäuse mittels zervikaler Dislokation wurden die Nieren entnommen. Im Anschluss wurden die Nieren entkapselt, zerkleinert und in Kollagenaselösung inkubiert. Die Inkubationszeit lag bei 30 Minuten bei einer Temperatur von 37°C . Um verbliebene große Nierenstücke zu entfernen, wurden die Proben in ein HBSS- bzw. HEPES-Medium gelegt. Anschließend wurden die Nierenproben durch ein $30\mu\text{m}$ Filter gedrückt. Die Zellsuspension wurde daraufhin für 5 Minuten bei 4°C bei 1100rpm zentrifugiert. Dann wurde der Niederschlag mit einem K1-Medium resuspendiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation der Proben auf unbeschichteten Petrischalen für 120 Minuten bei 37°C . Dabei hefteten sich Fibroblasten und Makrophagen am Boden der Petrischalen an. Primäre tubuläre Epithelzellen (TECs), die nicht adhären waren, wurden im Anschluss abpipettiert. Im Anschluss erfolgte eine erneute Zentrifugation für 5 Minuten bei 1100rpm. Nach dem Verwurf des Überstands wurden die TECs mit K1-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde daraufhin auf kollagenbeschichtete 6-well-Platten gegeben. Abschließend erfolgte eine erneute Inkubation bei einer Temperatur von 37°C und 5% Kohlenstoffdioxid in der Luft. Nach einer Woche bildeten die TECs eine teilweise am Boden der 6-well-Platten konfluierende Schicht.

2.9.3 Isolierung der CD45+, CD11b+ und CD11c+ Nierenzellen

Die Isolierung der CD45+, CD11b+ und CD11c+ Nierenzellen erfolgte mittels Magnetic Cell Separation, einem Verfahren zur Sortierung von Zellgemischen anhand von Oberflächenstrukturen. Das Prinzip der Isolierung von Zellen mittels sog. *MACS Micro-Beads* liegt in der Markierung der gesuchten Zellen mit magnetischen Partikeln und der anschließenden Detektion mittels Magnetfeld. Das gesuchte Oberflächenantigen wird an einen komplementären Antikörper gebunden. Dieser Antikörper ist an *MACS Micro-Beads* gekoppelt. In einem Magnetfeld werden anschließend die magnetischen Zellen von den unmaskierten Zellen getrennt [118].

Zunächst wurden die entnommenen Nieren zum Verdauen in 2ml Kollagenaselösung gelegt und zerkleinert. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 37°C , bei 5 % CO_2 und 100-prozentiger Luftfeuchtigkeit gelagert. Um verbliebene größere Stücke zu verkleinern, wurden die

Proben manuell homogenisiert. Daraufhin wurden die Nieren erneut für 15 Minuten verdaut. Die Zellsuspension wurde als nächstes durch einen 100µl Filter in ein 50ml Falcon gedrückt. Um sämtliche Zellen zu gewinnen, wurde der Filter mit *MACS* Puffer nachgespült. Danach wurde die Probe bei 1200rpm und 4°C über 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen. Als Nächstes wurden 20µl CD11c *Mikro-Beads* hinzugegeben. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei 4°C, unter Ausschluss von Licht und unter ständigem Rollen der Zellsuspension. Anschließend wurden die Proben erneut bei 1200rpm und 4°C über 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss verworfen. Ein, mit 3ml *MACS*-Puffer befeuchteter, 30µl Filter wurde auf die Säule des magnetischen Separators gesetzt. Das durch die Zentrifugation gewonnene Pellet wurde währenddessen in 300µl *MACS*-Puffer gegeben. Anschließend wurde die Suspension auf die Säule aufgetragen. Die Probe bewegte sich entlang der Schwerkraft durch die Säulen. Im Anschluss erfolgte die Waschung der Zellsuspension mit 3 x 3ml *MACS*-Puffer. Danach wurde die Suspension ein weiteres Mal über 5 Minuten zentrifugiert, bei 1200 Umdrehungen/Min. und einer Temperatur von 4°C. Als Nächstes wurde die Probe mit CD11b *Mikro-Beads*, nach dem oben beschriebenen Schema, inkubiert. Die Probe wurde im Anschluss auf die Säule aufgetragen und ein weiteres Mal zentrifugiert, für 5 Minuten, bei 1200rpm und 4°C. Im Anschluss wurden die zentrifugierten Pellets in Lysis Puffer (350µl) mit β-ME gegeben. Die in der Säule gebundenen Zellen wurden in ein neues Falcon gesetzt und mit 3ml *MACS*-Puffer eluiert. Es konnten mit diesem Isolationsprozess CD45+ Zellen, CD11b+ Zellen, CD11c+Zellen, sowie Parenchymzellen, der sog. „*flow through*“, gewonnen werden. Zur Vorbereitung der Versuche wurden eine Zentrifugation der isolierten CD11b+- bzw. CD11c-Zellen sowie der CD11b+- und CD11c-Zellen, über 5 Minuten bei 1200rpm und einer Temperatur von 4°C, statt. Daraufhin wurde der Überstand verworfen und die gewonnenen Zellen in RPMI-Medium resuspendiert. Als Nächstes wurden die Zellen auf 6-well-Platten bei 37°C und 5 % CO₂ für eine Nacht kultiviert. Vor Beginn der Stimulationsexperimente wurden Zellen mit einer Reinheit von > 95 % mittels Durchflusszytometrie isoliert. Nach 24 Stunden wurden Zellen für die RT-PCR bzw. den Elisa entnommen.

Mittels MTT-Assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wurde die metabolische Aktivität der Zellen beurteilt. Der MTT-Test bietet die Möglichkeit neben der metabolischen Aktivität auch die Zellviabilität im Rahmen einer Reduktionsreaktion zu evaluieren. Nach Metabolisierung des Farbstoffs MTT bilden sich Formazan-Kristalle, die in den lebenden Zellen akkumulieren. Im Anschluss werden die Zellen lysiert und der Farbstoff kolorimetrisch quantifiziert. Die Anzahl an metabolisch aktiven Zellen ist proportional zur Bildung an Formazan-

Kristallen. Die in dieser Arbeit durchgeführten MTT-Assays wurden entsprechend des Herstellerprotokolls zum Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit durchgeführt. Für die mRNA-Quantifizierung wurden die Zellen bei 1200rpm und einer Temperatur von 4°C über 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 350µl Lysis Puffer mit β-ME gegeben. Bis zur Isolation der RNA wurden die Zellen auf -20°C gelagert.

2.9.4 Isolierung von BMDMs

BMDMs (engl. *bone marrow derived macrophages*) sind Makrophagen, die sich aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark entwickeln. Zunächst wurde murines Knochenmark aus Femur und Tibia isoliert. Zur Lyse der Erythrozyten wurden die Knochenmarkszellen im Anschluss mit Ammoniumchlorid behandelt. Die Probe wurde im Anschluss mit 20 ng/ml M-CSF im RPMI-Medium, mit 10 % FCS, 1 % Natriumpyruvat, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren sowie 1 % Penicillin-Streptomycin kultiviert. Nach einer Woche wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen auf eine 12-Well-Platte transferiert und wie folgt stimuliert: Für die Induktion von proinflammatorischen Makrophagen wurde den Zellen 100 LPS und 10ng/ml IFN-γ zugegeben. Für die Polarisierung zu alternativ aktivierten Makrophagen wurde der Suspension 25ng/ml IL-4 und 25ng/ml IL-13 oder 10ng/ml IL-10 zugegeben. Die Kontrollgruppe blieb unbehandelt. 24 Stunden nach der Stimulation wurden die Makrophagen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die rekombinanten Zytokine wurden von ImmunoTools bezogen.

2.9.5 Stimulation der TECs und CD11b+ Zellen mit LPS

Die LPS-Stimulationsexperimente wurden mit den oben beschriebenen isolierten TECs und den aus murinem Knochenmark kultivierten myeloischen Zellen durchgeführt. $0,5 \times 10^6$ Zellen der Zelllinie J776 (MΦ, Makrophagen) wurden in 6-well-Platten mit einem Medium (RPMI) gegeben und bei 37°C bzw. 5 % CO₂ gelagert. Dann wurden die Proben mit den TECs, den CD11b+- sowie den CD11b- Zellen, stimuliert. Eine Gruppe wurde mit 100 ng/ml Ultra Pure LPS pro well stimuliert. Die Kontrollgruppe hingegen wurde nur mit normalem Medium stimuliert. Es folgte eine 72-stündige Inkubationszeit bei 37°C und 5 % CO₂. Nach einer Inkubation über 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden wurde jeweils die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Abschließend wurde mit Hilfe von RT-PCR die Menge an IRF4 mRNA quantifiziert.

2.9.6 Scratch assay

Der scratch assay dient der Beurteilung der Wundheilung in vitro. Über 24 Stunden wird die Regeneration eines Monolayers mit Hilfe eines Mikroskops erfasst. Die 6-well-Platten wurden zuvor markiert.

TECs wurden in 6-well-Platten, unter 2-prozentigem und 15-prozentigem FCS-Einfluss kultiviert. Um die Zellen langsam proliferieren zu lassen, erfolgte die Kultur zunächst unter 2-prozentigem FCS-Einfluss. Im Anschluss erfolgte die Kultivierung unter 15-prozentigem FCS-Einfluss. Bei Stimulation der Zellkultur wurde eine 4-stündige Inkubationszeit eingehalten, bevor der scratch mithilfe einer 1ml-Pipettenspitze durchgeführt wurde. Unmittelbar nach Durchführung des scratches wurden Fotos gemacht. Sie dienen als Referenzgruppe „0 Stunden“ für die später gemachten Fotos. Die Platten wurden für 24 Stunden im Inkubator gelagert. Die weiteren Fotoaufnahmen wurden zur „12., 24., 36., 48. und 72. Stunde“, nachdem der scratch durchgeführt wurde, angefertigt. Die Fotoauswertung fand per Analyse der Wundgröße, mithilfe des Programms Photoshop CS5 Extended®, Menüpunkt „Messungen“, am Computer statt. Die Wundgröße jedes einzelnen Fotos wurde hierfür in Relation zur Wundgröße der Referenzgruppe „0 Stunden“ gestellt.

2.9.7 In vitro LDH-Zelltodassay

| | | |
|-----------|----------------------------------|--------------------|
| LDH-Assay | Cytotoxicity Detection Kit (LDH) | Roche, Mannheim, D |
|-----------|----------------------------------|--------------------|

Mithilfe des LDH-Zelltodassays lassen sich Zelluntergang bzw. Zellüberleben quantifizieren. Bei Zelllyse wird das ubiquitär vorkommende Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) frei. Der LDH-Assay nutzt die enzymatische Aktivität von LDH und gibt indirekt Rückschlüsse über das Zellsterben. Im ersten Schritt setzt LDH, die nach Integritätsverlust der Zellmembran freigesetzt wird, aus dem Substrat des Kits Laktat zu Pyruvat um. Dabei reduziert es NAD^+ zu NADH/H^+ , welches wiederum die Umsetzung des Tetrazolium-Salzes zu seinem Formazanprodukt katalysiert. Diese Reaktion bedingt einen Farbumschlag von gelb zu rot (Abbildung 2). Auch vitale Zellen können diese zweite Reaktion bedingen. Deshalb ist darauf zu achten, dass nur zellfreie Überstände für den Test verwendet werden [119].

Zur Durchführung des Assays wurden TECs von IFR4-defizienten sowie Wildtyp-Mäusen isoliert und ausplattiert. Für die Induktion des Zelltods wurde H₂O₂ (1mM) benutzt. Zur Evaluation der maximalen LDH-Freisetzung wurde den Zellen die Zelllysesolution Triton X-100 3 % zugegeben. Als Kontrollgruppe dienten Proben, die ausschließlich mit einem Nährmedium stimuliert wurden. Eine weitere Gruppe wurde mit LPS (1µg/ml) stimuliert. Zunächst wurden die Proben für 12 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die Überstände nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C (230 x g) in eine unsterile 96-well-ELISA Platte überführt. Im Anschluss wurde 100µl des Reaktionssubstrats hinzugegeben und die Absorptionsmessung bei 492nm in der Dunkelkammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Der prozentuale Anteil an zugrunde gegangenen Zellen wurde nach folgender Formel berechnet:

Zelltod (in Prozent) = (Absorbance der Probe – Absorbance der Negativkontrolle) / (Absorbance der Positivkontrolle - Absorbance der Negativkontrolle)

2.9.8 Gewebe- und Immunhistochemie

| | |
|---|--|
| Picro Sirius Red Stain Kit (ab150681) | Abcam, Cambridge, England |
| Biotinylated Lotus tetragonolobus Lecitin (LTL) | Vector Laboratories, Peterborough, England |
| PAS | Bio-Rad, München, D |

Zur lichtmikroskopischen Analyse der Nieren wurden sowohl histochemische als auch immunhistochemische Färbemethoden angewendet.

Anfertigung der Paraffinschnitte: Nach erfolgter Nierenentnahme und Einbettung in Histosettes, Gewebefixierung in einem Medium aus 10 % Formalin und PBS. Als Nächstes wurde das Nierengewebe in flüssiges Paraffin eingelegt und die ausgehärteten Paraffinblöcke in Scheiben von je 2µm Dicke in der Frontalebene geschnitten. Anschließend wurden Objektträger mit 3-Aminopropyltriethoxysilan behandelt, die Schnitte darauf gegeben und in Alkohollösungen absteigender Konzentrationen zunächst vom Paraffin reingewaschen und anschließend rehydriert. Für jeweils 180 Sekunden erfolgte eine Waschung der Schnitte in Xylol, 100 % Ethanol, 95 % Ethanol, 80 % Ethanol, 50 % Ethanol und PBS. Als Nächstes wurde die endogene Peroxidase abgedunkelt, mit 30 % H₂O₂ in Methanol über 20 Minuten blockiert. Danach wurden die Schnitte erneut in PBS (2 x 5 Minuten) gewaschen. Im Anschluss wurden Antigene demaskiert mittels 3ml *Antigen unmasking solution* und je 300 ml destilliertem Wasser.

Zur Ermittlung von Schäden an den renalen Tubuli, wurden histologische Schnitte der Nieren angefertigt. Hierfür wurde das Nierengewebe mit der „Periodic Acid Schiff“ (PAS)-Methode gefärbt [53]. Hierbei werden Glykolgruppen mit der Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert und damit Muko- und Glukoproteine, Gluko- und Phospholipide und Muko-Polysaccharide nachweisbar. Die Aldehydgruppen bilden einen rötlichen Farbstoff mit der schwefligen sauren Fuchsinlösung (Schiff'sches Reagenz, (www.tk.de/rochelexikon)). Zur Darstellung des Tubulusschadens wurden die Schnitte der Nieren mit Lotus tetragonolobus lectin gefärbt. Zur Evaluierung der renalen Fibrosebildung wurden die Gewebeschnitte mit Picro Sirius Red gefärbt.

Protokoll zur PAS-Färbung:

| | |
|-------------------------|---------------------|
| Ammoniumpersulfat (APS) | Bio-Rad, München, D |
| Ethanol | Merck, Darmstadt, D |
| Formaldehydlösung 37 % | Merck, Darmstadt, D |
| PAS | Bio-Rad, München, D |
| Xylol | Merck, Darmstadt, D |

Die Paraffinschnitte wurden zunächst in der Perjodsäure (2 % in destilliertem Wasser, 5 Minuten) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Waschung für 5 Minuten in destilliertem Wasser. Als Nächstes wurden die Schnitte für 20 Minuten in der schwefligen sauren Fuchsinlösung inkubiert und erneut gewaschen. Zusätzlich wurden die Schnitte für 120 Sekunden in Hämatoxylin gegengefärbt und schließlich wieder gewaschen. Im letzten Schritt wurden die gefärbten Nierenschnitte in 90-prozentigen Alkohol getaucht, an der Luft trocknen gelassen und mit einem Deckglas abgedeckt.

Histopathologische Auswertung des Tubulusschadens

Die mit Lotus Tetragonolobus Lectin-gefärbten Schnitte konnten unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung evaluiert werden. Es wurden jeweils zehn sich überlappende Gesichtsfelder von zwei verblindeten Untersuchern ausgewertet. Es wurde nur das S3-Segment des proximalen Tubulus betrachtet, da die ischämiebedingten Schäden hauptsächlich hier entstehen. Die Tubulusschäden wurden anhand folgender Faktoren abgeschätzt: Zellnekrose, Zylinderformationen, Verlust des Bürstensaums, Dilatation des Tubuluslumens. Danach wurden den Prozentwerten Score-Punkte (von 0 bis 5) zugeordnet: 0: keine Schäden nachweisbar; 1: ≤ 10 % Schäden; 2: 11 bis 25 % Schäden; 3: 26 bis 45 % Schäden; 4: 46-75 % Schäden; 5: > 76 % Schäden.

Immunhistochemie: Makrophagen, Neutrophile Granulozyten

| | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| ABC-Substrat-Lösung | Vector, Burlingame, CA, USA |
| Methylgrün-Färbelösung | Fluka/Sigma, Deisenhofen, D |
| Mounting Medium Vecta Mount | Vector, Burlingame, CA, USA |
| Avidin | Vector, Burlingame, CA, USA |

| | |
|------------------------------------|-----------------------------|
| Biotin | Vector, Burlingame, CA, USA |
| biotinilierter Sekundär-Antikörper | Vector, Burlingame, CA, USA |

Verwendete Primär-Antikörper:

| | |
|---|-----------------------|
| Rat anti-mouse F4/80-Antikörper (1:50) | Serotec, Oxford, U.K. |
| Mouse-anti-smooth muscle actin (1:100) | Dako, Denmark |

| | |
|--|---|
| H ₂ O ₂ -Methanol-Mix: | 30 % H ₂ O ₂ in Methanol |
| Antigen-Demaskierungslösung: | 3ml unmasking-solution + 300ml destilliertes Wasser |

Analog zu den PAS-Färbungen, wurden das Nierengewebe auch bei den immunhistochemischen Färbungen zunächst für einen Tag in Formalinlösung (10 %) inkubiert. Als Nächstes wurde das Nierengewebe in Paraffin eingebettet, in 2µm dicke Scheiben geschnitten und mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe und Xylol entparaffinisiert. Für eine ausführlichere Beschreibung siehe Abschnitt „PAS-Färbung“. Als Nächstes wurden die Nierenschnitte für 20 Minuten in ein Gemisch aus H₂O₂ und Methanol im Dunkeln eingelegt. Im Anschluss wurden die Schnitte für je 5 Minuten zweimal mit PBS gewaschen. Mit diesem Schritt wurde die endogene Peroxidase blockiert. Als Nächstes wurden die Schnitte in einer Antigen-Demaskierungslösung inkubiert und für 10 Minuten auf über 100°C erhitzt. Während des Kochens wurde darauf geachtet, dass der Flüssigkeitsstand dem Ausgangsniveau entspricht. Anschließend wurden die Nierenschnitte bei Raumtemperatur gekühlt, mit PBS gewaschen und endogenes Biotin blockiert. Die Blockierung des Biotins wurde durch eine 15-minütige Inkubation mit Avidin und der anschließenden 15-minütigen Inkubation mit Biotin erreicht. Als Nächstes wurden die Schnitte mit verschiedenen Primär-Antikörpern immunhistochemisch gefärbt. Die Inkubationszeit variierte je nach Primerantikörper. Als Nächstes erfolgte eine 30-minütige Färbung der Nierenschnitte mit biotiniliertem Sekundär-Antikörper (1:300 in PBS). Im Anschluss wurden die Schnitte in einer ABC-Substrat-Lösung (Vektor) gelagert. Diese Inkubation erfolgte bei 18-13°C in der Feuchtkammer für die Dauer von 30 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte mit Methylgrün angefärbt. Zwischen den Färbungsschritten wurden die Nierenschnitte zweimalig mit PBS gewaschen. In einem letzten Schritt wurden die Nierenschnitte mit 96 prozentigem Alkohol

gewaschen, getrocknet und mit VectaMount (Vektor) befestigt. Durch die Waschung konnten überflüssige Farbpartikel und Xylen entfernt werden.

Histologische Auswertung mit Photoshop

Nach der Färbung der Nierenschnitte wurde diese in 50-facher Vergrößerung mittels Lichtmikroskop fotografiert. Bei 50-facher Vergrößerung war es möglich auf einem Foto sowohl die Nierenrinde, als auch das Nierenmark abbilden zu können. Anschließend erfolgte die Analyse der Fotos mit der Software Adobe Photoshop CS4 Extended Version. Nachdem das Bild ausgewählt wurde, wurde die Option „Auswahl“ und der Menüpunkt „Farbbereich“ ausgewählt. Im Anschluss wurde der Farbton markiert, der den signalpositiven Bereich repräsentiert. Das Computerprogramm findet im Anschluss die signalpositiven Flächen. Als Nächstes wurde die Messungen aufgezeichnet. Hierbei wurde die gesamte Fläche ermittelt. Die Auswertung erfolgt in der Skaleneinheit Pixel. Abschließend wurde der signalpositive Bereich in Prozent im Graphen angegeben, indem die bestimmten, signalpositiven Bereiche manuell ins Verhältnis zur Pixelfläche des Querschnitts gebracht wurde.

2.10 ELISA

ELISA (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) ist eine immunologische Methode zum Proteinnachweis und zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Das Prinzip dieses Nachweisverfahrens basiert auf der Bindung eines spezifischen Antikörpers an das Antigen, das nachgewiesen werden soll. Der Antikörper ist an ein Enzym gebunden, das nach der Antikörper-Antigenbindung eine Farbreaktion katalysiert. Dadurch wird die Präsenz des gesuchten Proteins nachgewiesen.

2.11 Western Blot

Der Western Blot ist ein Testverfahren um Proteine durch Übertragung (engl. *blotting*) auf eine Trägersmembran nachzuweisen. Die nachzuweisenden Proteine können im Anschluss mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden, bspw. mittels Markierung der nachzuweisenden Proteine mit einem radioaktiv strahlenden Antikörper.

Nach der operativen Entfernung der Nieren von IRF4-defizienten- bzw. Wildtyp-Tieren, wurde ein

ca. 1/5 der Gesamtmasse der Niere messendes Stück manuell zerkleinert. Als Nächstes wurde das Gewebe in Flüssigstickstoff schockgefroren. Im Anschluss wurden die Proben pulverartig zerkleinert und homogenisiert (100µl Lysepuffer: 50mM TrisHCL, 150mM NaCl, 4 % NP-40, 100µM Natriumorthovanadat Na_3VO_4 , 2 % Triton-X-100, 0,5 % Natriumdeoxycholat, 5mM EDTA, 300mM Sucrose und Proteaseinhibitoren, Roche, Penzberg). Nach der Homogenisierung erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 4°C. Im Anschluss wurden die Proben für 45 Minuten bei 30000rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde die Proteindichte mittels Bradford Test gemessen.

Als Nächstes wurden die zuvor extrahierten Proteine in 2 x Laemmli-puffer (30mM TRIS, 1 % SDS 5 % Glycerol und 0,0025 % Bromophenolblau) mit β -Mercaptoethanol gelöst. Daraufhin erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 95°C. Anschließend wurden die Proben auf 12 % SDS-Gel aufgetragen. Mithilfe von Elektrophorese wurden die Proben sowohl nach ihrer Masse als auch ihrer Ladung bei 120 V über 240 Minuten aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Eiweiße auf eine mit Methanol aktivierte PVDV Immobilon-P-Membran gegeben (BioRad Semi-Dry Blotting System, Eschborn). Darauffolgend wurden die Proben für eine Stunde bei 25 V geblottet. Als Nächstes wurden die Proben für ca. 10 Minuten auf dem Taumler in Ponceau-Farblösung (0,5 Ponceau-S in 1 % Eis-Essig, gelöst in Millipore- H_2O) gegeben. Somit wurde der Standard (peqGOLD Proteinmarker) differenzierbar und der erfolgreiche Transfer des Proteins konnte bestätigt werden. Nachdem die Proben im nächsten Schritt kurz in Wasser gewaschen wurden, wurden die Standardbanden markiert und für 60 Minuten mit 1-% Western-Blockierlösung geblockt. Nachfolgend wurde der Antikörper hinzugefügt und das Gemisch über ca. 12 Stunden inkubiert. Der polyklonale Anti-IRF4-Antikörper (1:1000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA) war in 0,5 % Western Blockierlösung gelöst. Es erfolgte zunächst fünf Mal eine Waschung mit TBS und TBS-Tween. Am Folgetag wurde der zweite Antikörper hinzugegeben. Dieser Antikörper markierte die Immunkomplexe auf Anti-IRF4-Antikörpern und IRF4. Es ist ein IgG-Antikörper (1:10000, in 0,5 % Blockierlösung, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), der an eine Peroxidase gebunden ist. Als Nächstes wurde die Probe für 60 Minuten mit dem zweiten Antikörper inkubiert und anschließend erneut fünfmal mit TBS und TBS-Tween gewaschen. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Darstellung der Chemielumineszenz (engl. *enhanced chemiluminescence*, ECL, Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg). Daraufhin folgte die tatsächliche Entwicklung. Je Membran wurden 2ml der Lösungen 1 und 2 der ECL im Dunkeln zusammengegeben und der Blot je für 60 Sekunden inkubiert. In dieser Zeit lief die enzymatische Farbreaktion ab. Im Anschluss wurde der Blot getrocknet, luftdicht verpackt und der Filmstreifen belichtet. Nach mindestens 60 Sekunden wurde eine ausreichende Abbildungsqualität erreicht.

2.12 Durchflusszytometrie

| | |
|----------------------------------|---|
| Kollagenase/DNase Lösung | 10mg Kollagenase, 1ml DNase, 9ml 1x HBSS |
| FACS-Puffer | 500 ml D-PBS, 1g BSA (0,2 %), 0,5g NaN ₃ (0,1%) |
| Paris-Puffer | 20mM Tris, 125mM NaCl, 10mM KCl, 10mM, C ₂ H ₃ NaO ₂ , 5mM D-Glukose pH 7,4, in 1 Liter Wasser |
| BD Pharmingen FITC BrdU Flow Kit | BD Pharmingen, Heidelberg, D |

Verwendete Antikörper:

| | |
|------------------------------|--------------------|
| anti-mouse CD11b BV786 | Biolegend, Fell, D |
| anti-mouse F4/80 PacificBlue | Biolegend, Fell, D |
| anti-mouse CD4 BV605 | Biolegend, Fell, D |
| anti-mouse CD45 AF700 | Biolegend, Fell, D |

Die Durchflusszytometrie (engl. *fluorescence-activated cell sorting*, FACS) erlaubt eine Bestimmung und Differenzierung von in Suspension befindlichen Zellen hinsichtlich mehrerer Dimensionen. So können Zellen nach ihrer Größe, Struktur, Granularität und intra- sowie extrazellulärer fluoreszenzmarkierter Zielstrukturen charakterisiert werden. Die Zellsuspension wird vom Durchflusszytometer durch eine Kapillare gedrückt. Dabei strömen die Zellen, aufgrund des laminären Hüllstroms der Trägerflüssigkeit, hintereinander aufgereiht durch die Kapillare. Während des Durchtritts durch die Kapillare werden die Zellen mit Laserlicht beschossen, was zu Beugungs- und Streuungseffekten führt. Als Forward- und Sideward-Scatter erfassen Detektoren im Durchflusszytometer diese beiden Parameter. Mit dem Forward-Scatter lässt sich die Größe einer Zelle bestimmen. Der Sideward-Scatter beschreibt die Zellgranularität. Um eine gemischte Zellpopulation weiter zu differenzieren, werden die Zellsuspensionen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenantigene oder intrazelluläre Bestandteile gefärbt. Farbstoffspezifisch emittiert der Antikörper nach Aktivierung durch die Laserstrahlung dann wiederum Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich. Dieses wird vom Durchflusszytometer gemessen. Damit sich die Wellenlängen nicht überlappen erfolgt zunächst ein Kompensationsschritt.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Differenzierung renaler Zellen anhand der

Oberflächenantigene CD45, CD11c und CD11b angewandt. Zunächst wurde die Niere von ihrer Kapsel befreit. Im Anschluss wurde die Niere in eine Petrischale mit ca. 3ml kaltem Paris-Puffer gelegt. Als Nächstes wurde das Organ mit einem Skalpell und einer Spritze zerkleinert, in ein 15ml Falcon überführt und zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 10ml gekühltem 1xHBSS-Medium gewaschen und in 5ml gewärmter Kollagenase/DNase-Lösung inkubiert. Die Inkubation dauerte 20 Minuten und fand bei einer Temperatur von 37°C statt. Im Anschluss erfolgte eine erneute Waschung mit 10ml HBSS-Lösung. Daraufhin wurde die Probe in 5ml 2mM EDTA gelöst. Es folgte eine Inkubation für 20 Minuten bei 37°C. Mit Hilfe einer Spritze und unterschiedlich großen Nadeln (19G, 26G und 30G) wurde das angedaute Nierengewebe schließlich zerkleinert. Daraufhin wurde die Probe erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 10ml gekühltem PBS ohne Ca/Mg gewaschen und anschließend in 1ml FACS-Puffer gegeben. Im Anschluss wurde die Probe durch einen 30µm Filter gedrückt. Daraufhin fand eine erneute Zentrifugation statt. Nach einer weiteren Suspension mit FACS-Puffer kam es zur Zellaufzählung. 100µl der Suspension wurden in einem FACS-Röhrchen mit einem Serum-Mix (5µl Mausserum + 5µl Rattenserum) vermischt und bei ca. 21°C für zehn Minuten inkubiert. Als Nächstes wurde der phosphorylierte Antikörper hinzugegeben und die Suspension für 60 Minuten bei 4°C in der Dunkelkammer inkubiert. Zuletzt erfolgten zwei erneute Waschungen mit 2ml PBS. Die Durchflusszytometrie wurde jeweils mit 300µl des resuspendierten Pellets durchgeführt.

2.13 Statistische Auswertung

Mindestens 8 Versuchstiere bildeten eine Versuchsgruppe. Die Ergebnisdarstellung erfolgt als Mittelwerte mit Standardabweichung (\pm SEM). Wenn die Daten der Stichprobe aus einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen oder die Versuchsgruppen aus mindestens 15 Versuchstieren bestand wurde der Student's T-test angewendet. Bei Versuchsgruppen von weniger als 15 Tieren oder wenn die Daten der Stichprobe nicht normalverteilt waren, wurde der Mann-Whitney-U-Test zur Auswertung benutzt. Bei p-Werten von weniger als 0,05 wurde von einer statistischen Signifikanz ausgegangen.

Kapitel 3

Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 IRF4-Expression nach Ischämie-Reperfusion in der Niere

3.1.1 IRF4-mRNA-Level in der Niere nach renaler IR

Voruntersuchungen zeigten, dass oxidativer Stress die renale IRF4-Expression induziert. Im Modell des akuten Nierenversagens wurden an C57BL/6-Wildtyp-Mäusen einseitig das Nierengefäßbündel für 45 Minuten abgeklemmt. Nach einer Reperfusionszeit von 1, 5 und 10 Tagen wurden die operierten Nieren und die *sham*-operierten Nieren explantiert und untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die IRF4-Expression ab dem 5. Tag kontinuierlich ansteigt [112]. Zur Untersuchung der chronischen Phase nach akuter Nierenschädigung wurde die IRF4-Expression nach Reperfusionszeiten von 21 und 35 Tagen ermittelt. Die Expression von IRF4 wurde anhand von qPCR bestimmt. Hierbei wurde die IRF4-Expression ins Verhältnis zur 18s-rRNA gesetzt. Die Versuchsgruppen bestanden jeweils aus fünf Tieren, deren Werte gemittelt wurden (\pm SME). Nach einem Anstieg der IRF4-Expression ab dem 5. Tag, erreichte sie ihren Höchstwert am 35. Tag nach IR. Die Kontrollnieren zeigten keine erhöhte IRF4-Expression, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Operation keinen Einfluss auf die IRF4-Induktion an der nicht operierten Niere hat (Abbildung 1). Mittels Western-Blot konnten diese Ergebnisse anhand der IRF4-Protein-Level am Tag 1, Tag 21 und Tag 35 nach IRI, bestätigt werden (Abbildung 2).

Die erhöhte Expression von IRF4 in der späten Phase nach akuter Nierenschädigung deutet darauf hin, dass IRF4 eine wichtige Rolle in der chronischen Phase einer Entzündungsreaktion spielt.

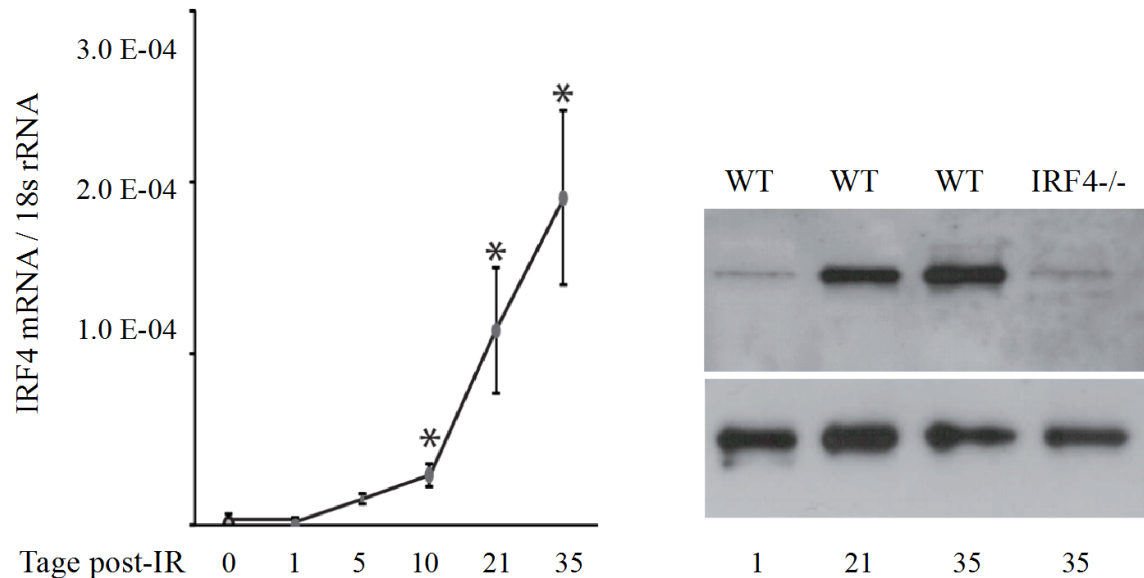


Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf der IRF4 mRNA- und Proteinexpression aus Nierengewebe bis zu 5 Wochen nach IRI. **Links.** Nach 45-minütiger einseitiger Perfusionsblockade der Nierengefäße von C57BL/6-Mäusen und darauffolgender Reperfusion für 1, 5, 10, 21 und 35 Tage wurden die Nieren explantiert und die Expression von IRF4 mittels qPCR bestimmt. Die Expression von IRF4 steigt kontinuierlich an. Ab dem 10. Tag wird sie signifikant. Der Höchstwert ist am 35. Tag erreicht. * $p < 0,05$ vs. Kontrollniere. **Rechts.** (Western Blot) IRF4-Protein-Level am Tag 1, Tag 21 und Tag 35 nach IRI.

3.2 Gesteigerte Expression von IRF4 in Immunzellen

Frühere Studien konnten zeigen, dass IRF4 hauptsächlich in myeloischen Zellen exprimiert wird [77, 78, 80, 112]. Um zu bestimmen welche renalen Zellen IRF4 exprimieren, wurden murine TECs, rDCs und Makrophagen aus Wildtyp-Mäusen kultiviert. Daraufhin wurde die Gesamt-RNA isoliert. Im Anschluss wurde die IRF4-Expression mittels qPCR quantifiziert. In TECs von Wildtyp-Tieren war keine IRF4-Expression unter Ruhebedingungen nachweisbar. CD11c⁺ Zellen und hier v. a. dendritische Zellen, zeigten eine erhöhte IRF4-Expression. Die höchste Expression von IRF4 konnte in Zellen, die unter Zugabe von M-CSF kultiviert wurden und das Oberflächenantigen CD11b tragen, gefunden werden. Damit zeigen Makrophagen die höchste Expression von IRF4 unter Ruhebedingungen (Abbildung 3a).

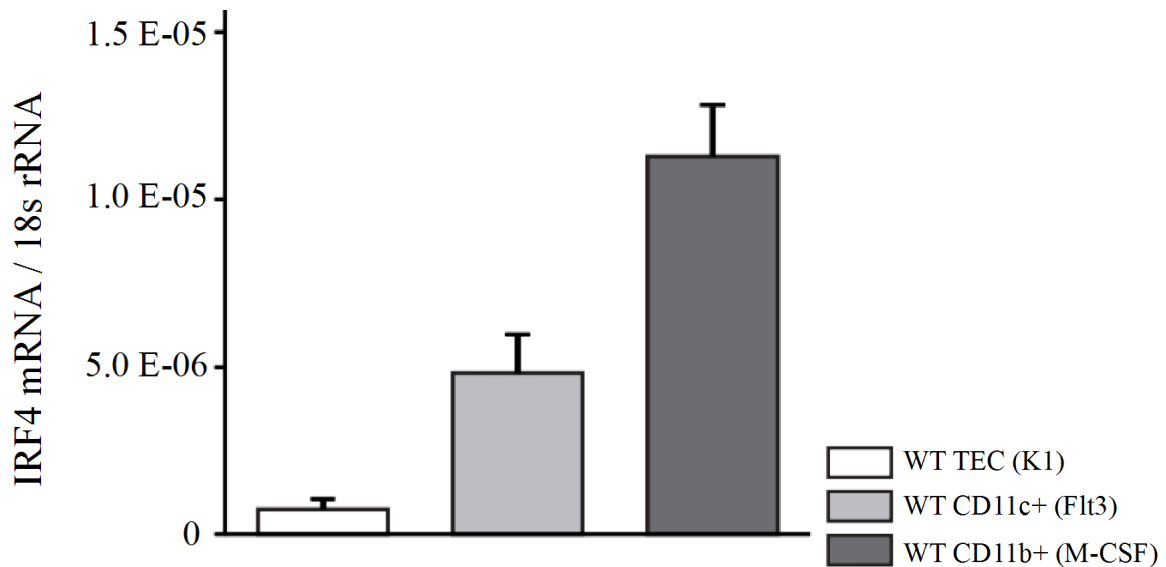


Abbildung 3a: Die höchste IRF4-Expression findet sich bei CD11b+ Zellen. Wildtyp-TECs, Wildtyp-CD11c+ Zellen und Wildtyp-CD11b+ Zellen wurden isoliert und die IRF4 mRNA mittels RT-PCR quantifiziert. Vor allem CD11b+ Zellen zeigten eine hohe IRF4-Expression unter Ruhebedingungen. TECs zeigten keine IRF4-Expression unter Ruhebedingungen.

3.2.1 Maximale Expression von IRF4 in Immunzellen nach 24-stündiger LPS-Stimulation

Als Nächstes haben wir eine Entzündungsreaktion simuliert, indem wir Wildtyp-TECs und BMDMs mit LPS stimulierten. Die Stimulation der Wildtyp-TECs und Wildtyp-CD11b+ Zellen mit LPS bewirkt über die Bindung an TLR-4 die Aktivierung eines wichtigen Signalweges nach IR [120]. Neben dem Stimulanz LPS, wurde als Kontrolle nur Medium verwendet. Nach einer Inkubation über 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden, fand die Isolation der mRNA statt. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und im Anschluss mit Hilfe von RT-PCR quantifiziert. Entsprechend der Voruntersuchungen konnte auch 6 bis 72 Stunden nach der LPS-Stimulation keine IRF4-Expression in kultivierten Wildtyp-TECs nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten CD11b+ Zellen sechs Stunden nach LPS-Stimulation von kultivierten BMDMs eine kontinuierlich steigende IRF4-Expression. Das Maximum erreichte sie nach 24 Stunden und blieb bis zu 72 Stunden über dem Ausgangsniveau. Ohne Stimulation zeigten alle Zellarten vergleichbare Mengen an IRF4-mRNA. IRF4 wird somit nach Stimulation mit einem TLR-Agonisten in myeloischen Zellen exprimiert. Im Vergleich zu anderen Regulatoren des TLR/MyD88-Signalwegs, wie z. B. A20 [121], wird IRF4 folglich leicht verzögert induziert, bleibt aber über einen längeren Zeitraum exprimiert (Abbildung 3b).

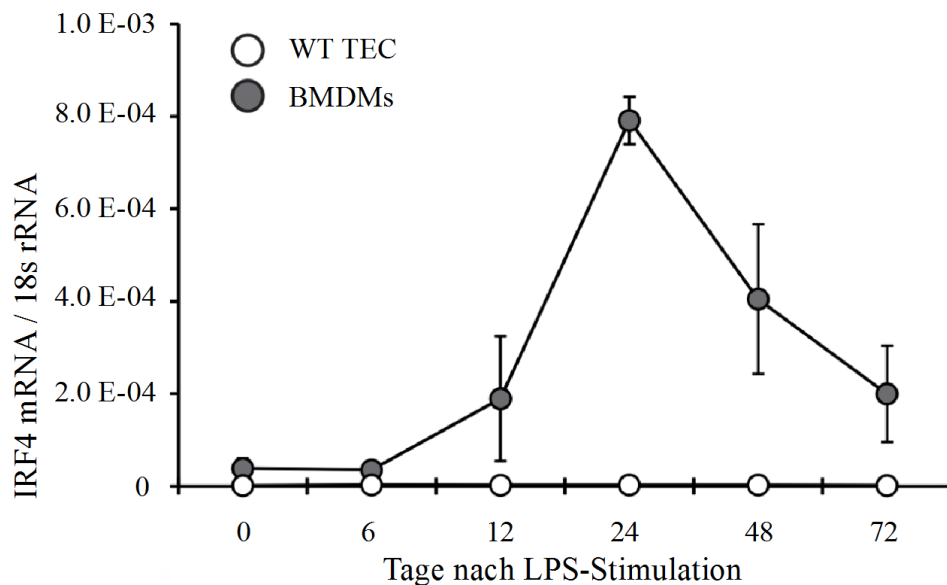


Abbildung 3b: Maximale IRF4-Expression nach 24-stündiger LPS-Stimulation. Zeitlicher Verlauf der IRF4 mRNA-Induktion nach LPS-Stimulation (100ng/ml) in kultivierten tubulären Epithelzellen (TECs) (weiß) und BMDMs (dunkelgrau). Im Anschluss erfolgte die Stimulation der aus C57BL/6-Mäusen isolierten TECs sowie der aus murinen Knochenmark kultivierten myeloischen Zellen mit Lipopolysacchariden (LPS). Die Zellen der Kontrollgruppe wurden ausschließlich mit Medium behandelt. Alle Zellen zeigten ohne Stimulation vergleichbar niedrige Mengen an IRF4-mRNA. Während die IRF4-Expression der Myeloidzellen 6 Stunden nach LPS-Stimulation kontinuierlich stieg und das Maximum nach 24 Stunden erreichte, blieb sie in den TECs trotz LPS-Stimulation unverändert.

3.3 Der Einfluss von IRF4 auf die Makrophagen in der chronischen Phase nach Ischämie-Reperfusion

Voruntersuchungen zur Funktion von IRF4 für die Migration von Immunzellen nach akuter Nierenschädigung konnten zeigen, dass IRF4 in der Niere in renalen DCs (CD45+/CD11c+ Zellen), nicht jedoch in renalen Parenchymzellen (CD45-/CD11c+ Zellen) exprimiert wird. 24 Stunden nach 45-minütiger IR war die IRF4-Expression in renalen DCs signifikant erhöht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es beim IRF4-defizienten Tier, im Vergleich zum Wildtyp, bis zum 10. Tag nach 45-minütiger unilateraler IR nicht zu einer vermehrten Rekrutierung von Makrophagen kommt [112].

Wir untersuchten nun den Einfluss des IRF4-Genotyps auf die Einwanderung von Immunzellen im Langzeitmodell nach akuter Nierenschädigung. Zunächst differenzierten wir, welche Zelltypen der myeloischen Zellreihe IRF4 in der chronischen Phase nach IR exprimieren. Hierfür wurden

CD45⁺ Zellen sowie CD11c⁺ und CD11b⁺ Immunzellen aus den Nieren gesunder Wildtyp-Mäuse untersucht. Nach einseitiger Abklemmung des Nierengefäßbündels an Wildtyp-Mäusen wurden nach einer Reperfusionszeit von drei Wochen die IR- und die Kontrollnieren explantiert. Die Zellen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit Hilfe der Durchflusszytometrie entsprechend ihrer Oberflächenantigene genauer differenziert. Zur Identifizierung von Leukozyten wurde der Oberflächenmarker CD45⁺ benutzt. Die Leukozyten wurden weiter differenziert in CD11c⁺ und CD11b⁺ Zellen. Im Anschluss wurde die Expression von IRF4 mit Hilfe von qPCR ermittelt. Dabei diente die 18s-rRNA als Referenzgen. Die Ergebnisse von 5 Tieren wurden gemittelt (\pm SME). Drei Wochen nach unilateraler IR bei Wildtyp-Mäusen zeigten CD45⁺ Zellen und CD11c⁺ Zellen, aber v. a. CD11b⁺ Immunzellen eine erhöhte IRF4-Expression (Abb. 4a).

Aus diesem Experiment ging hervor, dass IRF4 in der chronischen Phase nach akuter Nierenschädigung v. a. in CD11b⁺ Immunzellen, wie Makrophagen, exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde in einem nächsten Schritt die Anzahl der Makrophagen in den postischämischen Wildtyp-Nieren in histologischen Schnitten ermittelt. Nach 45-minütiger unilateraler Abklemmung der Nierengefäße von Wildtyp-Mäusen und einer Reperfusionszeit von 10 Tagen, 3 Wochen und 5 Wochen wurde die Menge an Makrophagen in den Nieren histologisch ermittelt. Die Schnitte der Nierenproben wurden zunächst mittels F4/80 Färbung gefärbt und im Anschluss mit Hilfe von der Computersoftware Photoshop ausgewertet. Hierzu wurden Schnitte aus Nierenproben der C57BL/6-Mäuse nach einer Reperfusionszeit von 10 Tagen, 3 Wochen und 5 Wochen, verwendet. Die kontralateralen Nieren der Wildtyp-Mäuse zeigten zu jedem Zeitpunkt niedrige Mengen an Makrophagen. Ab dem 10. Tag kam es zu einer vermehrten Einwanderung von Makrophagen in den postischämischen Nieren. Nach einer Reperfusionszeit von 3 Wochen zeigte sich die höchste Menge an Makrophagen, die bis zur 5. Woche wieder abnahmen (Abbildung 4b). Diese Daten deuten auf eine immunmodulierende Funktion von Makrophagen v. a. in der chronischen Phase nach IR hin.

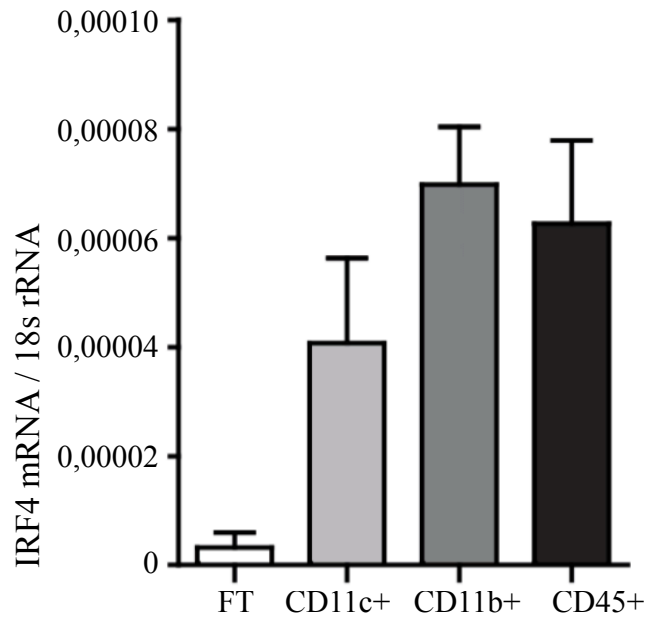


Abbildung 4a: IRF4 mRNA Expression nach Ischämie-Reperfusion in CD11c+ und Cd11b+ Zellen sowie CD45+ Immunzellen. An Wildtyp-Mäusen (n=5) wurde die 45-minütige unilaterale Ischämie-Reperfusion der Nierengefäße durchgeführt und nach 21 Tagen Reperfusionszeit CD45+ Zellen sowie CD11c+ und CD11b+ Zellen isoliert. Abschließend wurde jeweils die Expression von IRF4 mit Hilfe von qPCR ermittelt. Der weiße Balken zeigt den “*flow-through*” des MACS-Isolationssystems. Der schwarze Balken zeigt die CD11c+ Zellen, der hellgraue Balken die CD11b+ Zellen und der dunkelgraue Balken zeigt die CD45+ Zellen. Nach IR ist IRF4 in allen drei Zellreihen nachweisbar, v. a. jedoch in den CD11b+ Zellen.

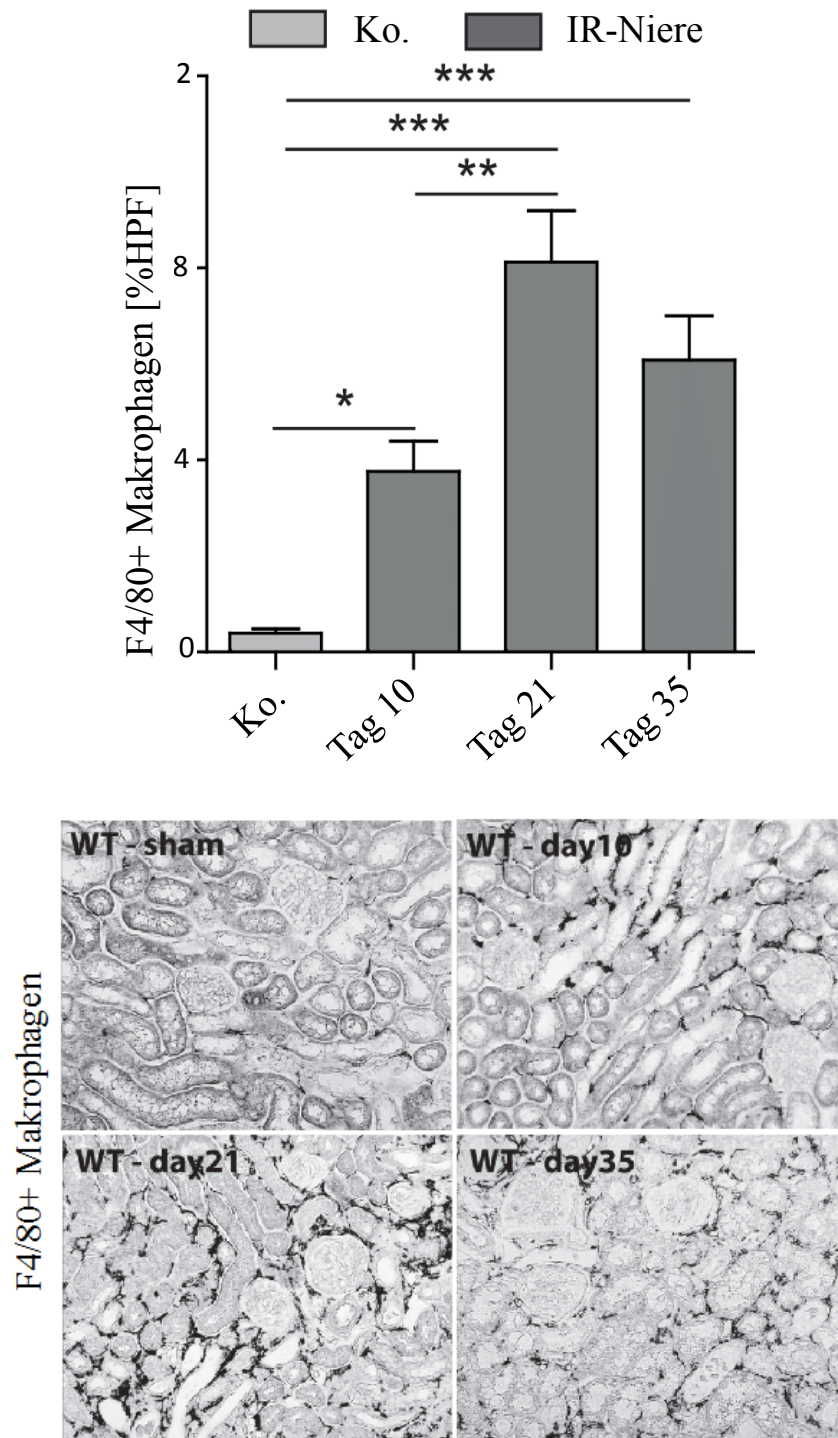


Abbildung 4b: Vermehrte Infiltration von Makrophagen in der chronischen Phase nach Ischämie-Reperfusion. In Wildtyp-Mäusen wurde eine 45-minütige IR durchgeführt und damit ein akutes Nierenversagen verursacht. Nach 10 Tagen, 21 Tagen oder 35 Tagen wurden die Nieren explantiert. Es folgte die histologische Färbung der Nierenschnitte mit F4/80-Färbung. Die Bildausschnitte wurden in 50-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mittels Photoshop Software. Es zeigt sich ein Anstieg der Menge von Makrophagen ab dem zehnten Tag. Den Höhepunkt der Makrophageninfiltration findet sich am Tag 21 nach Ischämie-Reperfusion. Am 35. Tag zeigt sich eine Abnahme der Menge an Makrophagen. Die Daten wurden stellen den Mittelwert des signalpositiven Bereichs gemittelt aus 5 Gesichtsfeldern je Niere dar (\pm SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

3.4 IRF4 hat keinen Einfluss auf die Regeneration und den Zelltod von tubulären Epithelzellen

Voruntersuchungen zur Bedeutung von IRF4 für das akute Nierenversagen zeigten, dass IRF4 ein negativer Regulator der TLR-vermittelten Entzündung ist. Nach unilateraler Abklemmung der Nierengefäße und einer Reperusionszeit von 1 bis 10 Tagen zeigten sich bei IRF4-knockout-Mäusen verglichen mit Wildtyp-Tieren signifikant höhere Zytokin- und Chemokinlevel. Die IRF4-Defizienz geht somit mit einer erhöhten akuten Entzündungsreaktion einher und führt letztlich zu verstärkter Tubulusschädigung [112]. Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass IRF4 die Expression von Zytokinen und Chemokinen, wie TNF- α und Cxcl2 in myeloischen Zellen, jedoch nicht in nicht-myeloischen TECs, unterdrückt (Abbildung 5a und b).

Neben dem Einfluss von IRF4 auf die unmittelbare Entzündungsreaktion, lag unser Augenmerk auf der Funktion von IRF4 bei renalen Heilungs- und Proliferationsprozessen nach akuter Nierenschädigung. Einige Studien konnten zeigen, dass IRF4 auch eine regenerationsfunktion besitzt. So zeigten *Guo et al.*, dass IRF4 neuroprotektiv wirkt, indem es Neurone vor dem durch einen Schlaganfall bedingten Zelltod schützt [122].

Um zu klären, ob IRF4 Einfluss auf die Regeneration und Proliferation von TECs nach akuter Nierenschädigung hat, wurde der Regenerationsassay, „*scratch assay*“, durchgeführt: Primäre renale Tubuluszellen wurden nach der unter Material und Methoden beschriebenen Methode isoliert. Nach Entfernung der Kapsel und vor der Zerkleinerung wurden die Nieren der IRF4-defizienten Mäuse und der Wildtyp-Tiere mit einer Präzisionswaage gewogen. Damit konnten bei unterschiedlich großen Mäusen eine standardisierte Verteilung der Tubulusfragmente auf die Wells-Platten gewährleistet werden. Die Verteilung folgte hierbei einer auf Erfahrungswerten beruhenden Verdünnungstabelle. Die TECs wurden in 6-well-Platten kultiviert. Zunächst wurden die TECs unter 2-prozentigem FCS-Einfluss kultiviert, um die Zellen langsam proliferieren zu lassen. Zum Ausschluss der Minderversorgung mit einem Nährmedium erfolgte im Anschluss die Kultivierung unter 15-prozentigem FCS-Einfluss.

Jedes Well einer 6-well-Platte wurde in 4 gleichgroße Quadranten geteilt. Pro Well wurden zwei parallellaufende Scratches gesetzt. Somit ergaben sich pro Well jeweils 4 auszuwertende Scratches. Die Auswertung des Scratch Assays erfolgte über die Phasen-Kontrast-Mikroskopie. Es wurde jeweils nach 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden der prozentuale Anteil der verbleibenden

Wundfläche quantifiziert. Die Fotoauswertung fand per Analyse der Wundgröße, mithilfe des Programms Photoshop CS5 Extended®, Menüpunkt „Messungen“, am Computer statt. Die Wundgröße jedes einzelnen Fotos wurde hierfür in Relation zur Wundgröße der Referenzgruppe „0 Stunden“ gestellt.

Weder unter 2-prozentigem noch unter 15-prozentigem FCS-Einfluss konnte ein signifikanter Unterschied in der Geschwindigkeit der Wundheilung zwischen IRF4-knockout- und Wildtyp-TECs festgestellt werden (Abbildung 5c und d). Somit zeigt IRF4 weder eine regenerative noch eine proliferative Wirkung auf TECs.

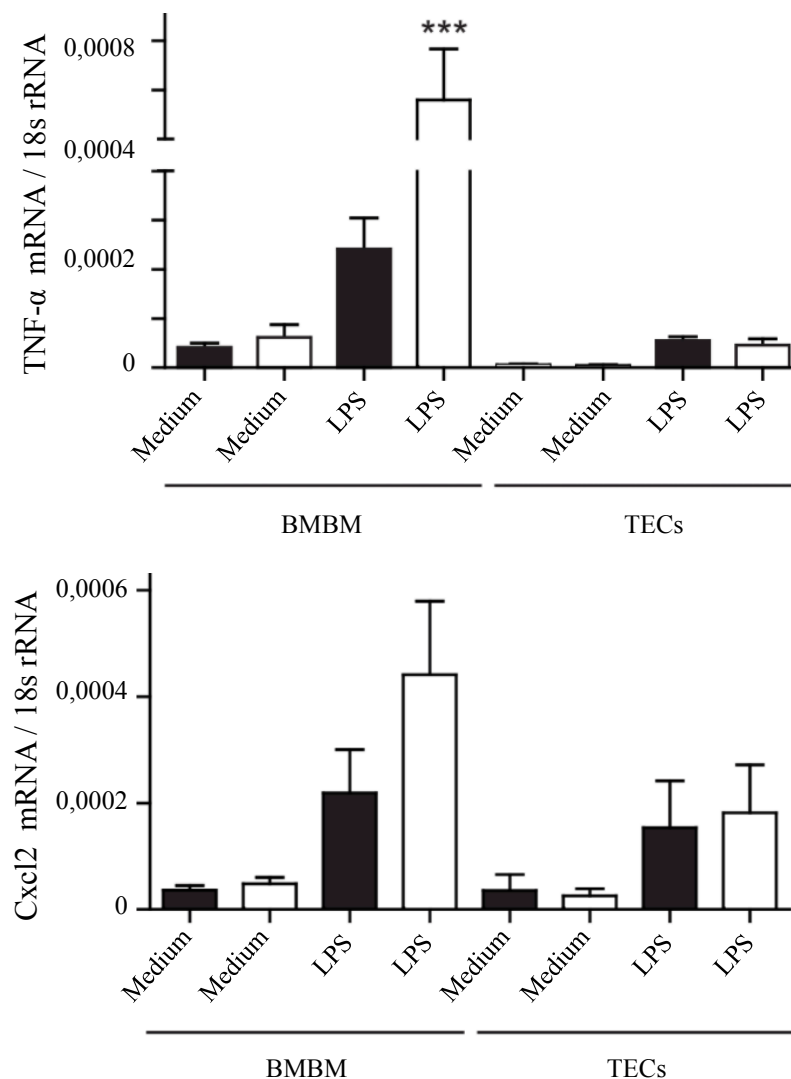


Abbildung 5a und b: IRF4 unterdrückt die Expression von TNF- α und Cxcl2 in myeloischen Zellen, nicht aber in TECs. In murinen Knochenmarksmakrophagen (BMBM) und tubulären Epithelzellen (TECs) wurde die *Tnf- α* und *Cxcl2*-mRNA Expression nach Stimulation mit LPS bzw. Medium mittels qPCR ermittelt. Die schwarzen Balken zeigen die mRNA-Level der Wildtyp-Tiere. Die weißen Balken zeigen die renalen mRNA-Level der IRF4-defizienten Mäuse. Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar. ***p<0,001.

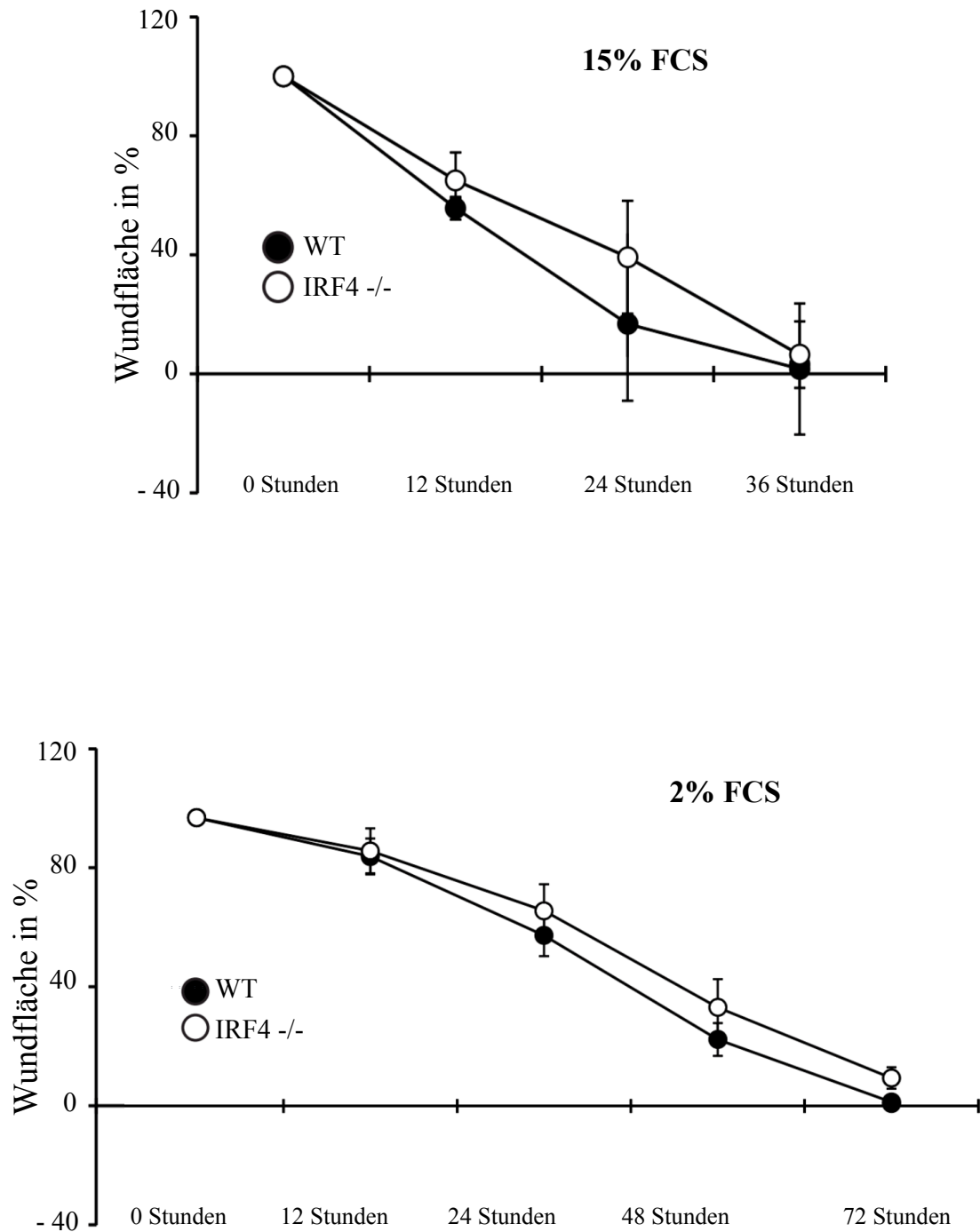


Abbildung 5c und d: IRF4 hat keinen Einfluss auf die Regeneration und den Zelltod von tubulären Epithelzellen. Primäre Tubuluszellen von C57BL6-Wildtyp-Mäusen und IRF4-defizienten Mäusen wurden in 6-Well Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde mechanisch eine Wunde zugeführt. Nach 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden wurde der prozentuale Anteil der verbleibenden Wundfläche quantifiziert und mittels Photoshop ausgewertet. Weder unter 2-prozentigem noch unter 15-prozentigem FCS-Einfluss zeigten sich Unterschiede in der Wundheilung von IRF4-knockout- und Wildtyp-TECs. Somit hat IRF4 weder eine regenerative noch eine proliferative Wirkung auf TECs.

Im Anschluss wurde der MTT-Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der TECs von IRF4-defizienten- sowie Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Der MTT-Test bietet die Möglichkeit neben der metabolischen Aktivität auch die Zellviabilität im Rahmen einer Reduktionsreaktion zu evaluieren. Nach Metabolisierung des Farbstoffs MTT bilden sich Formazan-Kristalle, die in den lebenden Zellen akkumulieren. Im Anschluss werden die Zellen lysiert und der Farbstoff kolorimetrisch quantifiziert. Die Anzahl an proliferierenden Zellen ist proportional zur Bildung von Formazan-Kristallen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die metabolische Aktivität von TECs IRF4-defizienter Tiere und Wildtyp-Tiere nicht unterschied. Diese Ergebnisse bestätigen, dass IRF4 nach IR in TECs weder die Regeneration noch die Proliferation beeinflusst (Abbildung 5e).

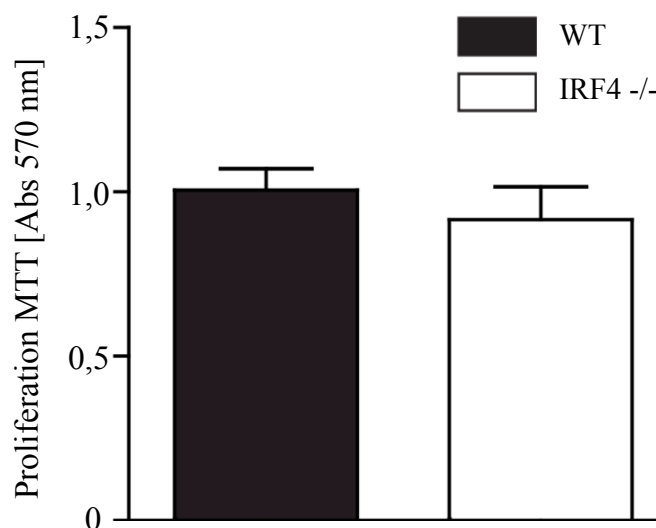


Abbildung 5e: Die metabolische Aktivität von TECs unterschied sich nicht zwischen IRF4-defizienten und Wildtyp-Tieren. Der Farbstoffs MTT wird von den lebenden Zellen metabolisiert und es bilden sich Formazan-Kristalle, die in den Zellen akkumulieren. Nach Lyse der Zellen wurde der Farbstoff colorimetrisch bei 570nm quantifiziert. Im MTT-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der metabolischen Aktivität von Wildtyp-TECs und IRF4-defizienten TECs.

Um die Bedeutung von IRF4 für den Zelluntergang und das Zellüberleben von TECs weiter zu quantifizieren wurde der LDH-Assay durchgeführt. Es wurden TECs von IRF4-defizienten sowie Wildtyp-Mäusen kultiviert und mit Triton-X, Nährmedium, LPS (1µg/ml) oder H₂O₂ stimuliert. Anschließend wurde der LDH-Gehalt, als Marker für das Zellsterben, quantifiziert.

Die Stimulation der TECs IRF4-defizienter Mäuse und Wildtyp-Mäuse mit Triton-X wirkt 100-prozentig zytotoxisch und somit als Referenzgruppe für ein absolutes Zellsterben. Als weitere Referenzgruppe dienen die TECs, welchen ausschließlich Nährmedium zugesetzt wurde. Hierbei kam es zum Zellsterben von ca. 30 % sowohl bei IRF4-defizienten TECs als auch bei Wildtyp-TECs. Wurde den tubulären Epithelzellen LPS oder H₂O₂ zugesetzt kam es zu einem zusätzlichen Zellsterben von ca. 10-20 %, verglichen mit der Referenzgruppe, die ausschließlich Nährmedium erhielt. Insgesamt zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Zellsterben IRF4-defizienter TECs und Wildtyp-TECs, weder nach Zugabe des Nährmediums, noch nach Stimulation mit LPS oder H₂O₂ (Abbildung 5f).

Diese Ergebnisse bestätigen, dass IRF4 in TECs bei Ischämie keinen Einfluss auf die Proliferation, die Regeneration und den Zelltod hat.

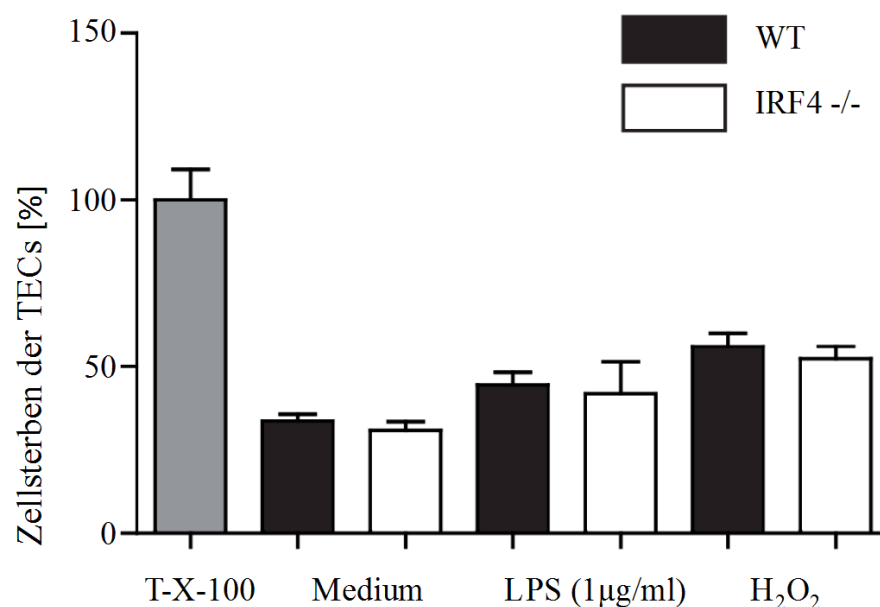


Abbildung 5f: Kein signifikanter Unterschied zwischen dem Zellsterben IRF4-defizienter TECs und Wildtyp-TECs. Es wurden TECs von IRF4-defizienten sowie Wildtyp-Mäusen kultiviert und mit Triton-X, Nährmedium, LPS (1µg/ml) oder H₂O₂ stimuliert. Weder nach Zugabe des Nährmediums, noch nach Stimulation mit LPS oder H₂O₂, zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Zellsterben von IRF4-defizienten- und Wildtyp-TECs.

3.5 IRF4 beeinflusst die Entstehung eines CAANV

Basierend auf dem zeitlichen Verlauf der IRF4-Expression nach akuter Nierenschädigung und der Rolle von IRF4 für das angeborene Immunsystem, haben wir angenommen, dass IRF4 auch die chronische Phase nach akuter Nierenschädigung beeinflusst. Die Bedeutung von IRF4 für die Entstehung eines chronisch-auf-akuten-Nierenversagens wurde mit Hilfe des Langzeitmodells nach akuter Nierenschädigung untersucht. Dieses Verfahren wurde in Voruntersuchungen entwickelt und bietet die Möglichkeit den Einfluss von IRF4 auf die Regeneration der Niere zu untersuchen [123]. IRF4-defizienten- und C57BL/6-Wildtyp-Mäusen wurden bei 35-37°C für 45 Minuten das Gefäßbündel der linken Niere abgeklemmt. In der operierten Niere wurde so das akute Nierenversagen indiziert. Die kontralaterale Niere wurde nicht manipuliert und diente als Kontrollniere. Nach einer Reperfusionszeit von 5 Wochen wurde den Mäusen zunächst Blut abgenommen, um das Serumkreatinin und das Serumharnstofflevel zu bestimmen. Beide Parameter sind Indikatoren für die Nierenfunktion und geben Rückschlüsse auf die Rolle von IRF4 beim CAANV. Bei IRF4-knockout Mäusen zeigten sich signifikant höhere Serumkreatininlevel im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Abbildung 6). Somit führt die IRF4-Defizienz im Modell des CAANV zu einer Nierenfunktionseinschränkung.

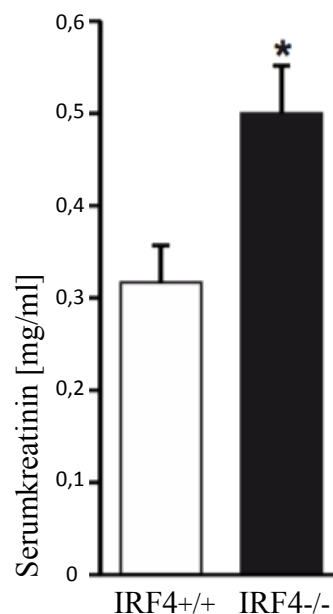


Abbildung 6: IRF4-Defizienz verstärkt das Ausmaß des CAANV. In Wildtyp-Mäusen lag der Serumkreatininwert 5 Wochen nach 45-minütiger IRI im Mittel bei 0,32mg/dl. Bei IRF4-defizienten Tieren lag der Serumkreatininwert signifikant erhöht bei ca. 0,52mg/dl. Somit zeigten IRF4-knockout Mäuse im Modell des CAANV signifikant höhere Serumkreatininlevel im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Die dargestellten Daten sind gemittelte Werte aus je 5 Versuchstieren (\pm SEM). * $p < 0,05$ vs. Wildtyp-Tier.

3.6 IRF4 begrenzt die chronische Entzündungsreaktion

Der Einfluss von IRF4 auf die Regulation der Inflammation wurde im Modell des CAANV untersucht. Hierfür wurde in IRF4-defizienten Versuchstieren und Wildtyptieren eine unilaterale Ischämie-Reperfusion für 45 Minuten durchgeführt. Nach einer Reperfusionsdauer von 5 Wochen wurden die Nieren explantiert. Die mRNA-Expression der proinflammatorischen Mediatoren, wie TNF- α , INF- γ , IP10, Ccl2, IL-12 und Ccr2 war im postischämischen Nierengewebe von IRF4-defizienten Tieren im Vergleich zu WT-Mäusen erhöht (Abbildung 7). Somit hemmt IRF4 die chronische Entzündungsreaktion nach akuter Nierenschädigung.

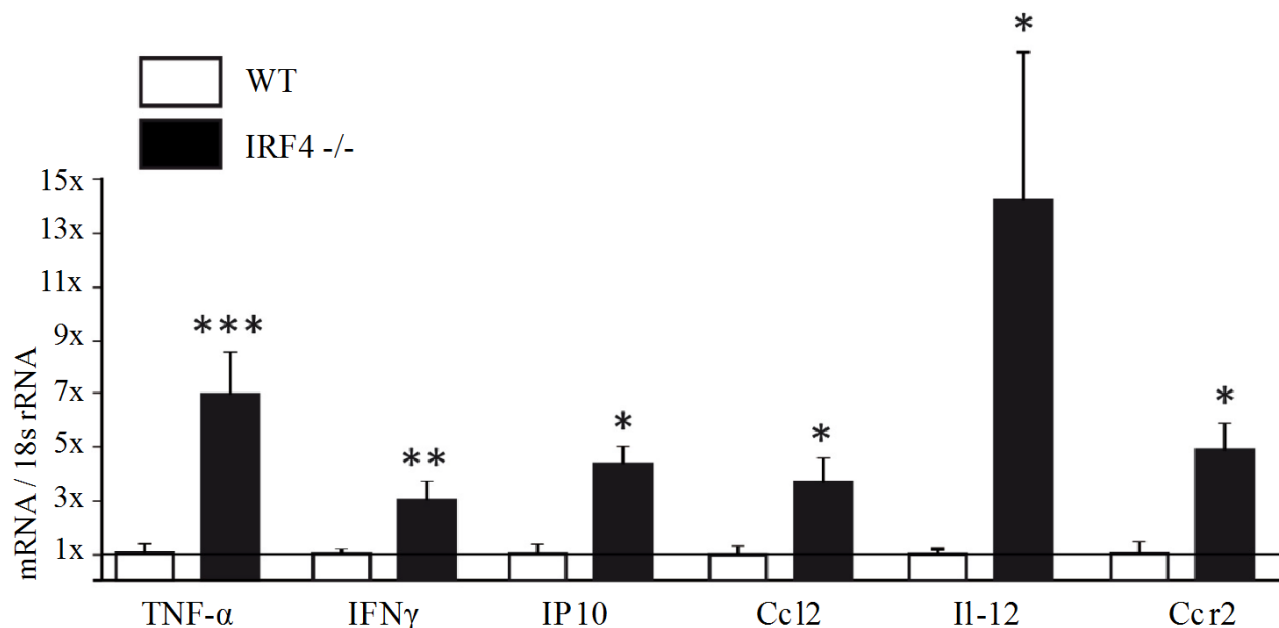


Abbildung 7: Die Expression verschiedener Zytokine und Chemokine in der postischämischen Niere IRF4-defizienter und WT-Tiere im Modell des CAANV. Nach 45-minütiger unilateraler IRI und einer Reperfusionszeit von 5 Wochen, wurde aus den Nieren die mRNA isoliert. Im Anschluss wurde die Zytokin- und Chemokinexpression und mittels qPCR bestimmt. Es werden C57BL6-Mäusen und IRF4-defiziente-Mäuse verglichen. IRF4-defiziente Mäuse weisen 5 Wochen nach Reperfusion signifikant erhöhte Zytokin- und Chemokinwerte auf. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.7 IRF4 verhindert die Entstehung atropher Nieren

Im Anschluss wurde der Einfluss von IRF4 auf die Nierenmorphologie im Modell des CAANV untersucht. Hierfür wurde in IRF4-defizienten Versuchstieren und Wildtypnieren eine unilaterale Ischämie-Reperfusion für 45 Minuten durchgeführt. Nach einer Reperfusionsdauer von 5 Wochen wurden die Nieren explantiert. Sowohl bei den postischämischen Nieren der IRF4-defizienten Mäuse, als auch bei den operierten Wildtypnieren, kam es zu einem signifikanten Gewichts- und Größenverlust. Im Vergleich zu den postischämischen Wildtypnieren, war der renale Gewichts- und Größenverlust bei den operierten IRF4-defizienten Nieren jedoch signifikant höher. Die postischämischen Nieren der IRF4-defizienten Mäuse waren verglichen mit den Wildtyp-Nieren optisch atrophiert und es zeigte sich eine kompensatorische Hypertrophie der kontralateralen Niere.

IRF4 verhindert somit nach akuter Nierenschädigung die Entstehung von atrophen Nieren (Abbildung 8). Zur weiteren Charakterisierung des Phänotyps wurden aus den Nieren der Wildtypnieren und IRF4-defizienten Tiere, histologische Schnitte hergestellt, gefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

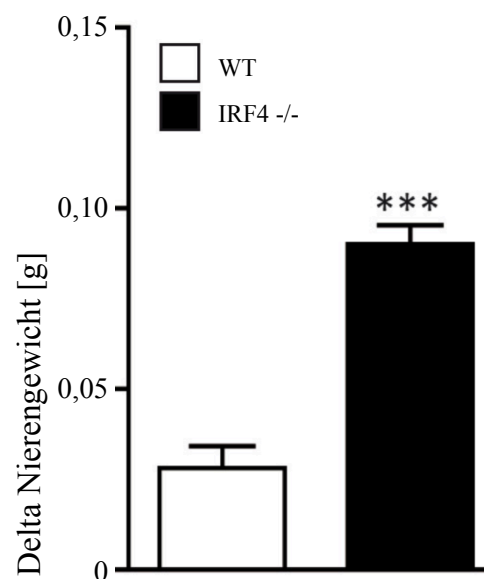


Abbildung 8: Das Ausmaß der chronischen Nieren-schädigung im Modell des CAANV. An IRF4-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen erfolgte die unilaterale IR mit einer 45-minütigen Ischämiezeit. 5 Wochen danach wurden beide Nieren explantiert, fotografiert und das Nierengewicht bestimmt. Sowohl in der IRF4^{-/-}-Gruppe, als auch in der Gruppe der Wildtyp-Tiere kam es bei den operierten linken Nieren (IR) zu einem Gewichtsverlust. Dieser fällt in der Gruppe der IRF4-defizienten Tiere größer aus. Darstellung des Gewichts als Delta: Das Gewicht der postoperativen Niere wurde vom Gewicht der nicht operierten Niere subtrahiert. Der Gewichtsverlust der IRF-defizienten operierten Nieren ist signifikant höher. Somit bedingt die IRF4-Defizienz im chronischen Modell des ANV mehr Gewebeschwund. ***p<0,001.

3.8 IRF4 schützt vor dem Tubulusverlust nach akuter Nierenschädigung

Der Größen- und Gewichtsverlust der postischämischen Nieren resultierte aus einem Verlust an tubulärer Zellmasse, was wiederum eine vergrößerte Dichte an Glomeruli in der Nierenrinde bedingt (Abbildung 9). Zunächst wurde anhand der Lotus tetragonolobus lectin-Färbung unter 100-facher Vergrößerung mit Hilfe des Mikroskops der prozentuale Anteil der Tubulusschäden untersucht. Der Tubulusschaden wurde nach folgenden Kriterien evaluiert: Ausmaß an Nekrosen, Zylinderformationen und Verlust des Bürstensaums. Des Weiteren wurden Erweiterungen des Tubuluslumens im kortikomedullären Übergang berücksichtigt, denn grade hier besteht der größte Bedarf an Sauerstoff und die Zellen reagieren besonders sensibel auf Ischämie. Die Vergleichsgruppen bestanden aus je 8 bis 10 Versuchstieren, deren Werte gemittelt wurden (\pm SEM). Es zeigten sich signifikant mehr Schäden im Bereich der Tubuli IRF4-defizienter Mäuse verglichen mit den Wildtyp-Mäusen. In den Kontrollnieren wurden keine signifikanten Werte ermittelt. Somit hat die Intervention keinen schädigenden Einfluss auf das Tubulussystem. Die IRF4-Defizienz bedingt folglich im Modell des CAANV die Verstärkung der Tubulusschäden. Auch die erhöhte Dichte der verbleibenden Glomeruli pro HPF zeigt den Verlust der tubulären Zellmasse an: Die postischämische Niere der IRF4-knockout Tiere hatte signifikant mehr Glomeruli, verglichen mit den postischämischen Nieren von C57BL6-Mäusen.

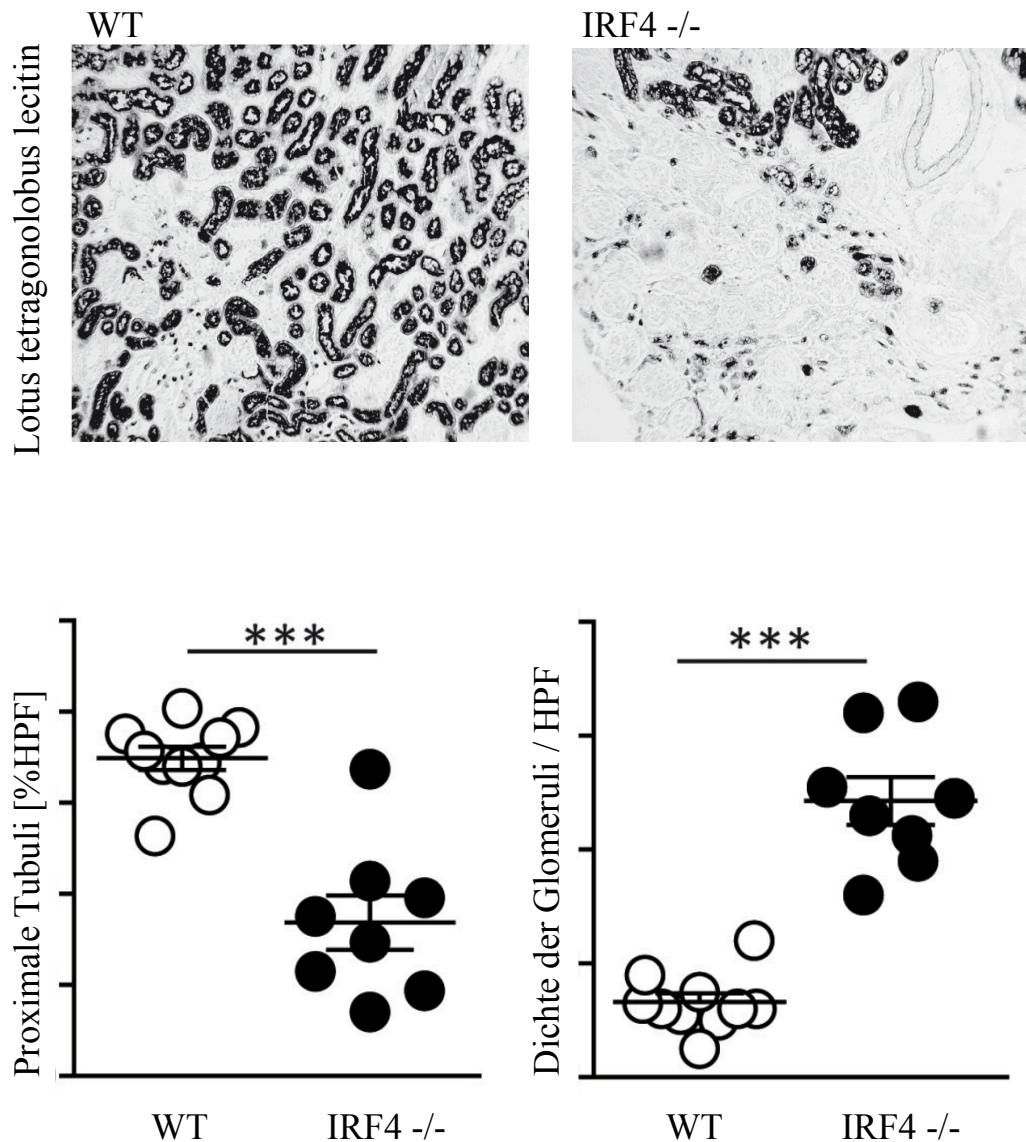


Abbildung 9: (oben) Tubuläre Schädigung im Modell des CAANV. Nach 45-minütiger ischämisch bedingter Hypoxie und 5-wöchiger Reperfusion an Wildtyp- und IRF4-defizienten-Versuchstieren (n=8-10) wurde nach Färbung mit Lotus tetragonolobus lectin (Abbildung 10a) bei 100-facher Vergrößerung das Ausmaß der Tubulusschäden mittels Evaluationsscore bestimmt. Hier dargestellt sind die Ergebnisse IR-defizienter und *sham*-operierter Kontrollnieren nach einem Reperfusionsintervall von 5 Wochen. Die Nierentubuli wurden mittels Quantifizierung der *tubular cross-sections* per HPF ermittelt (n= 8 bis 10 Versuchstiere. Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnitt von mindestens drei high power fields pro Tier). **(Unten) Aufgrund des Verlusts von TECs kommt es zur Kumulation von Glomeruli.** (Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnitt von mindestens 3 high power fields pro Tier). Bei IRF4-knockout Mäusen konnte im Bereich des Nierenkortex, verglichen mit den operierten Wildtyp-Nieren, eine erhöhte Dichte an Glomeruli nachgewiesen werden. Die postischämischen Nieren der IRF4-defizienten Tiere zeigten signifikant mehr Schäden im Bereich der Nierentubuli in IRF4-knockout-Tieren verglichen mit den Wildtyp-Tieren. *** p<0.001.

3.9 IRF4 verhindert die übermäßige Fibrosierung nach akuter Nierenschädigung

Fibrotischer Umbau und vermehrte extrazelluläre Matrix sind charakteristisch für die chronische Nierenschädigung. Wir nehmen an, dass IRF4-Defizienz zu der Entwicklung eines CAANV beiträgt. Deshalb wurden die postischämischen Nieren der IRF4-defizienten Mäuse auf den Gehalt an interstitieller Fibrose untersucht. Nach 45-minütiger Ischämie und einer fünfwöchigen Reperusionszeit wurden histologische Schnitte hergestellt und mit smooth muscle actin (alpha-SMA) und Picro-rot-Färbung anfärbt. Im Anschluss wurden die Schnitte mittels Lichtmikroskop fünfzigfach vergrößert und fotografiert. Daraufhin wurden die Schnitte mit Hilfe von Photoshop ausgewertet. Es zeigten sich in den postischämischen Nieren der IRF4-defizienten Mäuse eine signifikant vermehrte Akkumulation von extrazellulärer Matrix im Vergleich zu den Wildtypnieren. Die kontralateralen Kontrollnieren der IRF4-defizienten Mäuse und die Nieren der Wildtyp-Tiere wiesen keine verstärkte Anreicherung von extrazellulärer Matrix auf. Auch morphologisch unterschieden sie sich nicht voneinander. Durch den Mangel an IRF4 wird nach akuter Nierenschädigung folglich durch vermehrt extrazelluläre Matrix produziert. Dadurch kommt es zu einer progredienten Fibrosierung der postischämischen Nieren (Abbildung 10). Die IRF4-Defizienz bedingt somit einen vermehrten renalen Gewebeschaden. Die operierten Nieren fibrosieren und die kontralaterale Nieren hypertrophieren kompensatorisch. Aufgrund des Gewebeschwunds bei IRF4-Defizienz, kommt es zum renalen Funktionsverlust.

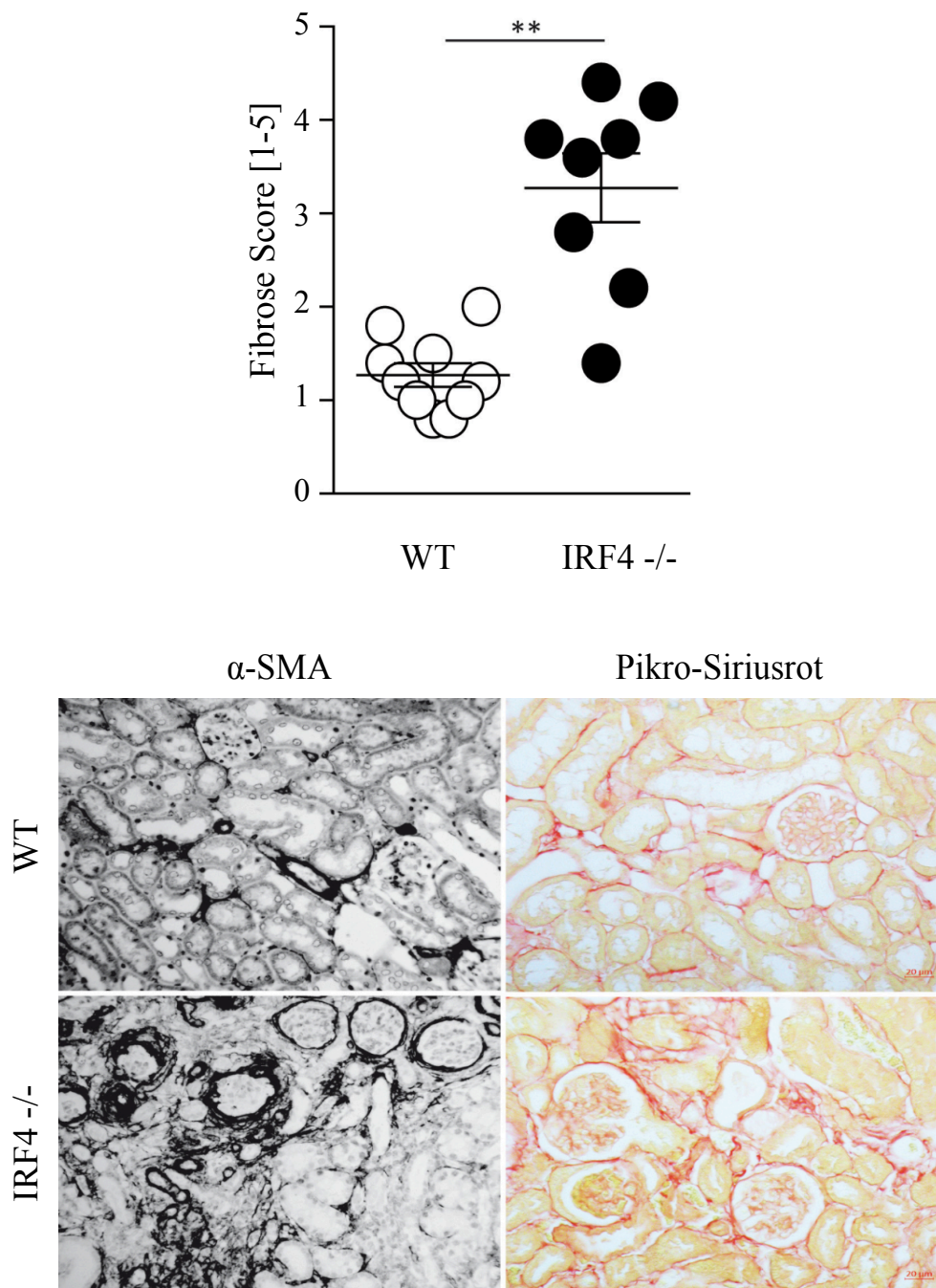


Abbildung 10: IRF4-Defizienz führt im Modell des CAANV zur übermäßigen Fibrosierung. Nach 45-minütiger unilateraler IRI und einer Reperfusionszeit von 5 Wochen, wurden die Nieren der IRF4-defizienten und Wildtyp-Tieren mit smooth muscle actin (alpha-SMA) und Picro-Siriusrot-Färbung angefärbt (n= 8 bis 10 Versuchstiere pro Gruppe). Bei 50-facher Vergrößerung wurden die histologischen Schnitte mittels Lichtmikroskop fotografiert und mit Hilfe von Photoshop ausgewertet. Hierbei wurde der prozentuale Anteil an positiv-gefärbten Bereichen erfasst. In der postischämischen Niere der IRF4-knockout-Mäuse zeigte sich eine signifikant vermehrte Akkumulation von extrazellulärer Matrix verglichen mit den postischämischen Wildtyp-Nieren. **p<0,05

3.10 IRF4-Defizienz führt zur verstärkten Produktion profibrotischer Marker

Die atrophischen Nieren wurden nun weiter charakterisiert. Zunächst wurde die mRNA aus den postischämischen Nieren der Wildtyp-Tiere und der IRF4-knockout-Mäuse isoliert, um profibrotische Marker zu bestimmen. Die mRNA wurde in cDNA umgeschrieben und im Anschluss mit Hilfe von RT-PCR quantifiziert. Die IRF4-Defizienz führte in den postischämischen Nieren, verglichen mit den dazugehörigen kontralateralen Nieren, zur signifikanten Erhöhung der Expression fibrosetypischer Marker, wie *Fsp1*, *Fibronectin*, *Kollagen-1a*, *TGF-beta*. Nur in den operierten Nieren der IRF4-defizienten Mäusen kam es zu einer Induktion der für interstitielle Fibrose typischen Moleküle (Abbildung 11).

Aufgrund der IRF4-Defizienz kommt es in den postischämischen Nieren zur progredienten Produktion profibrotischer Mediatoren. Aufgrund von tubulärer Atrophie und Akkumulation von extrazellulärer Matrix wird dadurch die Ausbildung eines chronischen Nierenversagens bedingt.

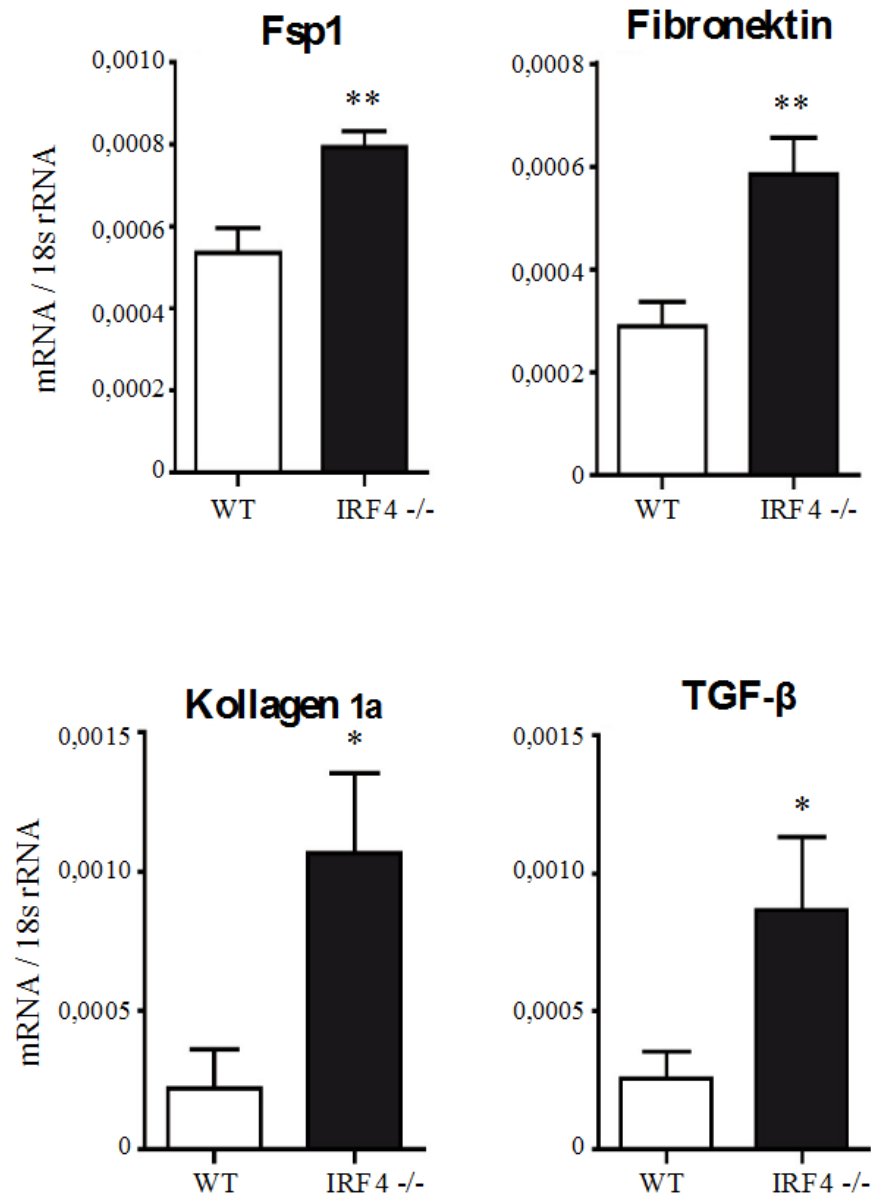


Abbildung 11: Induktion profibrotischer Mediatoren in der postischämischen Niere der IRF4-knockout-Mäuse. Aus Wildtyp-Tieren (IRF4 +/+) und IRF4-knockout Tieren (IRF4-/-) wurde 5 Wochen nach 45-minütiger Ischämie/Reperfusion mRNA isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe von RT-PCR quantifiziert. Im Vergleich zu den postischämischen Nieren der Wildtyp-Mäusen, zeigte sich in den IRF4-defizienten Mäusen eine signifikante Induktion Fibrose-spezifischer mRNA (*Fsp1*, *Fibronectin*, *Kollagen-1a*, *TGF-beta*). Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von min. 5 Tieren pro Gruppe. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.11 IRF4-Defizienz führt zu einer persistierenden M1-prädominanten Entzündung

Voruntersuchungen zeigten, dass die renale Zytokin-Basisexpression in IRF4^{+/+} und IRF4^{-/-} Mäusen niedrig ist. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen C57BL6-Mäusen und IRF4-knockout-Mäusen nachgewiesen werden. Im Modell der akuten Nierenschädigung zeigten IRF4-defiziente-Tiere jedoch signifikant erhöhte Chemokin- und Zytokinwerte verglichen mit den C57BL6-Mäusen. 24 Stunden nach 45-minütiger Ischämie-Reperfusion wiesen die Nieren IRF4-defizienter Tiere signifikant höhere Level an IL-6 und TNF-alpha auf. Die IRF4-Defizienz führt somit nach akuter Nierenschädigung zu einer verstärkten Immunantwort von myeloischen Zellen, die wiederum zu einer gesteigerten akuten Entzündungsreaktion führt [112]. Im Modell des CAANV wurde deutlich, dass das Fehlen von IRF4 zu renalem Gewebeschaden mit Funktionsverlust und zu vermehrter Fibrosierung führt. Fünf Wochen nach 45-minütiger Ischämie-Reperfusion wiesen die Nieren IRF4-defizienter Tiere signifikant höhere mRNA-Expressionslevel an Nierenschadensparametern, wie Ngal, Mmp2 und Mmp9, auf. Daneben zeigten sich bei IRF4-Defizienz reduzierte Expressionslevel von Transkripten, die auf eine epitheliale Regeneration hinweisen, wie Zo-1, Occludin und E-Cadherin. Die nicht-operierten Kontrollnieren der IRF4-defizienten sowie WT-Tiere zeigten keine signifikanten Veränderungen (Daten nicht dargestellt). Somit fördert das Fehlen von IRF4 die chronische Nierenentzündung, führt zu verstärktem Verlust der TECs und bedingt den Übergang vom akuten zum chronischen Nierenversagen. IRF4 hat keinen Einfluss auf die Wundheilung und Regeneration von TECs (s.o.) und wird v. a. in Immunzellen, besonders in Makrophagen, exprimiert (s.o.). Es führt im Modell des CAANV zur verstärkten Makrophagenmigration (s.o.) und ist ein wichtiger Mediator der Makrophagenpolarisation. Deshalb sind wir davon ausgegangen, dass IRF4-Defizienz zu einer persistierenden M1-Makrophagen-prädominanten Entzündung in der chronischen Phase nach IR führt. Dabei bleibt die Makrophagenpolarisierung zu M2-Makrophagen aus. Wir nahmen an, dass die IRF4-defizienten Tiere, trotz Abwesenheit profibrotischer M2-Makrophagen, ein verstärktes chronisches Nierenversagen entwickeln.

Um diese Annahme weiter zu untersuchen, wurde zunächst das Modell des CAANV auf Marker einer chronischen Entzündungsreaktion und Merkmale zur Differenzierung des vorherrschenden Makrophagen-Subtyps untersucht. Hierfür wurden die mRNA-Level proinflammatorischer Zytokine aus den postischämischen Nieren 5 Wochen nach IR bestimmt. Die mittels RT-PCR

bestimmten Werte der mRNA proinflammatorischer Zytokine zeigten 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusion signifikante Unterschiede zwischen den postischämischen Wildtyp-Nieren und den Nieren der IRF4-defizienten Tiere. Nach genauer Differenzierung wird deutlich, dass dieses Zytokinprofil dem der proinflammatorischen M1-Makrophagen entspricht. Auch die mRNA-Expression von Lcn2, einem Marker für tubuläre Schädigung, war in den postischämischen Nieren der IRF4-knockout-Tiere signifikant höher, verglichen mit den postischämischen Nieren des Wildtyp-Tiers.

Somit führt das Fehlen von IRF4 zu einer progredienten M1-Makrophagen-prädominanten renalen Inflamationsreaktion und verhindert die Ausheilung des akuten Nierenversagens. IRF4 ist folglich ein wichtiger Mediator der Phase der Regeneration. Es verhindert das Fortbestehen der Entzündung nach akuter Nierenschädigung und somit die Entstehung einer chronischen Nierenschädigung.

3.12 Vermehrte Induktion von M1- nicht aber M2-spezifischen Markern in Makrophagen durch IRF4-Defizienz

In der frühen Phase nach hypoxischem Nierenschaden schützt IRF4 vor einer übersteigerten akuten Entzündungsreaktion. Wir konnten zeigen, dass es bei IRF4-Defizienz in der chronischen Phase nach IRI zu vermehrter Makrophageninfiltration kommt (Abbildung 12). Weitere Voruntersuchung zeigten, dass IRF4-Defizienz in der akuten Phase nach IRI aufgrund von Hyperinflammation und einem M1-Makrophagen-prädominanten Milieu zu vermehrter Nierenschädigung führt [112]. Wir nehmen an, dass die übermäßige akute Entzündungsreaktion bei IRF4-Defizienz auch die chronische Nierenschädigung beeinflusst.

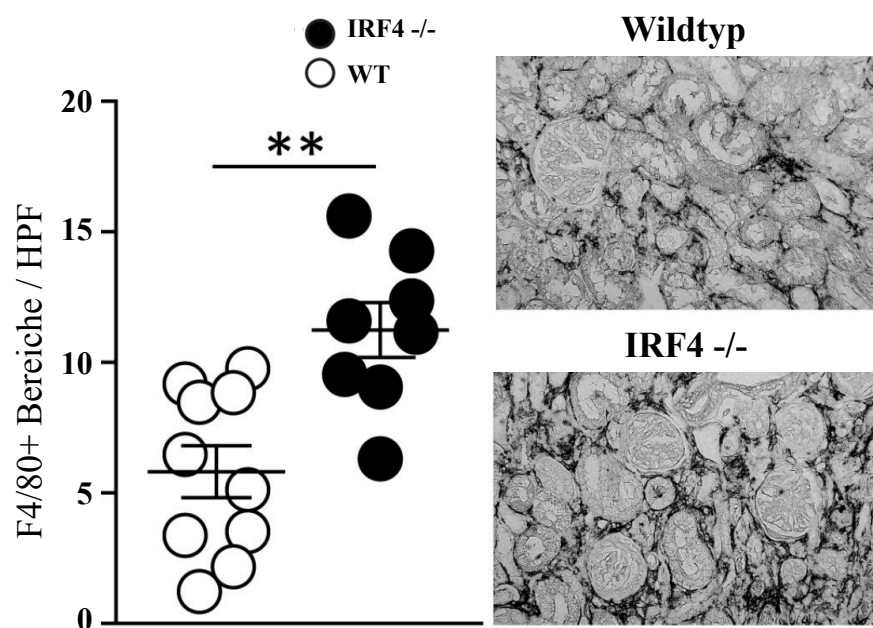


Abbildung 12: Vermehrte renale Makrophageninfiltration fünf Wochen nach IRI bei IRF4-Defizienz. Nach 45-minütiger einseitiger Ischämie und fünfwöchiger Reperfusion wurden die Nieren von Wildtyp- und IRF4-defizienten Mäusen entnommen und mittels F4/80-Färbung angefärbt. Es erfolgte die quantitative Auswertung der Makrophageninfiltration pro HPF (n= 8-10 Versuchstiere pro Gruppe, jeder Punkt stellt den Durchschnitt von mindestens drei ausgewerteten HPFs pro Tier dar). Es zeigt sich eine vermehrte Makrophagenmigration im IRF4-defizienten Tier. **p<0,01.

Unsere Hypothese ist, dass die chronische Inflammation nach IRI aktiv von IRF4 reguliert wird. Um zu zeigen, dass IRF4-defiziente Mäuse auch ohne eine akute Entzündungsreaktion nach IRI ein stärkeres CNV entwickeln, wurden im nächsten Schritt Immunzellen mittels Clodronat depleziert. Aufgrund der Depletion von Immunzellen zeigen sowohl die Wildtyp-Tiere als auch die IRF4-defizienten Tiere niedrige Entzündungswerte in der akuten Phase nach IR. IRF4-defiziente Mäuse zeigten 10 Tage nach IR und Injektion von Clodronat im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine vermehrte Makrophagenmigration und eine verstärkte Nierenschädigung im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (Abbildung 13a-d). Damit konnte die Annahme, dass IRF4 die Makrophagenpolarisation beeinflusst und sowohl die akute als auch die chronische Entzündungsreaktion hemmt, bestätigt werden.

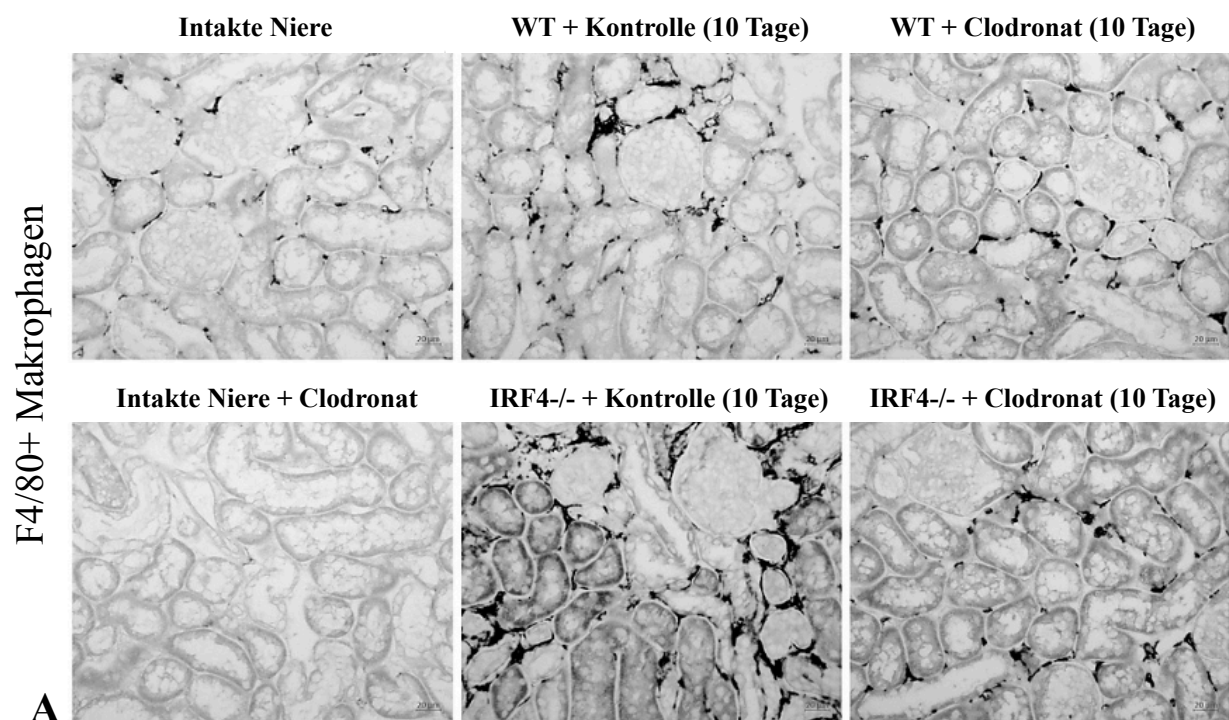


Abbildung 13a: Clodronat verhindert die vermehrte Makrophagenmigration bei IRF4-Defizienz nach IRI. Nach i.v.-Injektion von Ko.-Liposomen bzw. Clodronat, wurde die 45-minütige unilaterale IR an WT- und IRF4-/- Mäusen durchgeführt. Nach 10 Tagen wurden die Nieren mittels F4/80-Färbung gefärbt. Im Vergleich zur WT-Niere, zeigte sich eine deutlich verstärkte Makrophagenmigration bei IRF4-Defizienz. Diese konnte durch i.v.-Gabe von Clodronat verhindert werden.

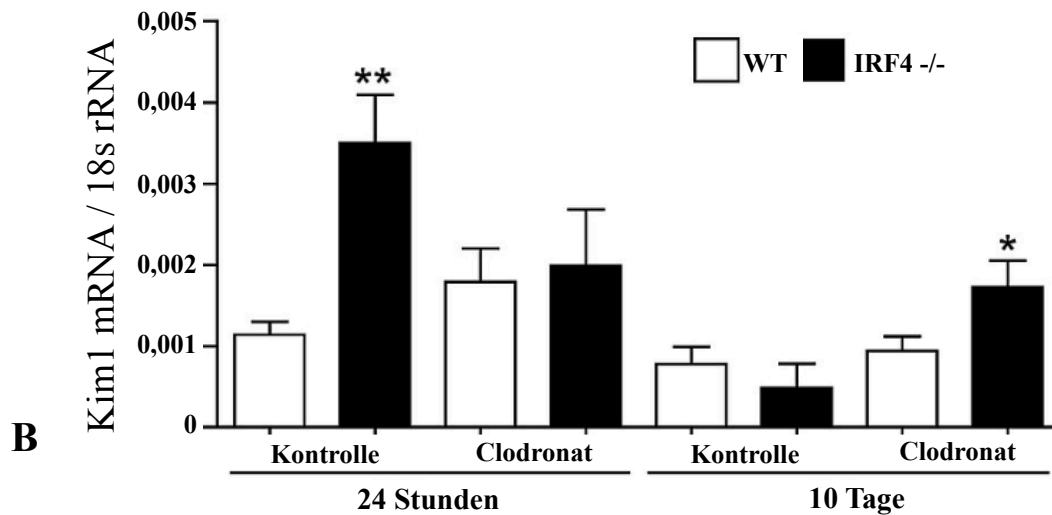


Abbildung 13b: Clodronat verhindert die durch IRF4-Defizienz hervorgerufene Nierenschädigung. Nach i.v.-Injektion von Ko.-Liposomen bzw. Clodronat und 45-minütiger unilateraler IR an Wildtyp-Mäusen und IRF4-knockout Mäusen, zeigte sich, dass die Depletion von Makrophagen und DCs nach zehn Tagen beim IRF4-defizienten Tier vor Nierenschaden schützt. Auf Proteinebene zeigen sich erhöhte Werte des Nierenschadensparameters *Kim-1*.

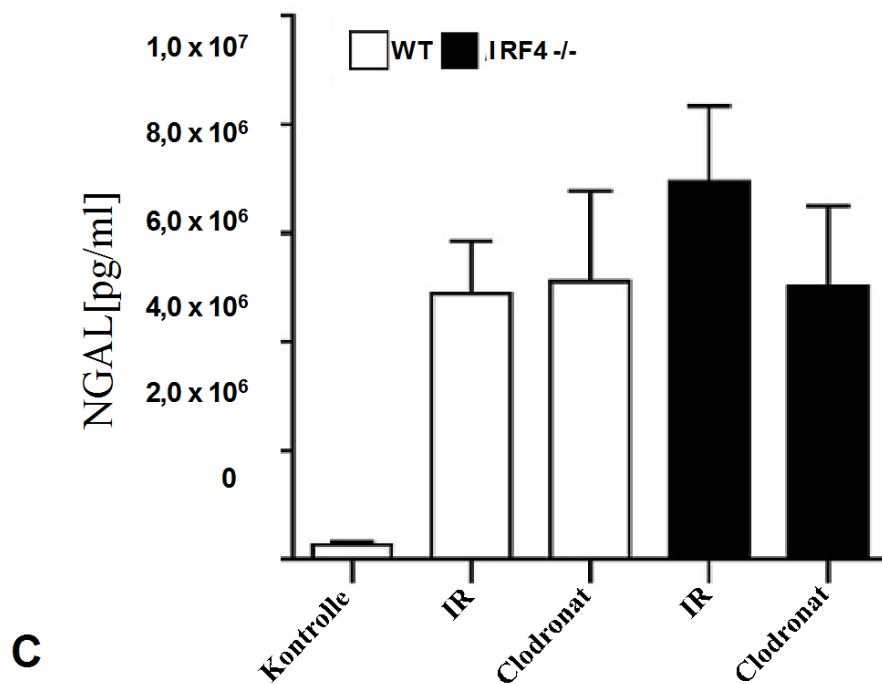


Abbildung 13c: Nach i.v.-Injektion von Ko.-Liposomen bzw. Clodronat und 45-minütiger bilateraler IR an WT-Mäusen und IRF4^{-/-} Mäusen durchgeführt. Nach 24 Stunden wurden die Nieren entnommen. Mittels ELISA wurden die Proteinlevel von *NGAL* untersucht. Im WT- und im IRF4-defizienten Tier zeigten sich gleiche Proteinlevel von *NGAL*.

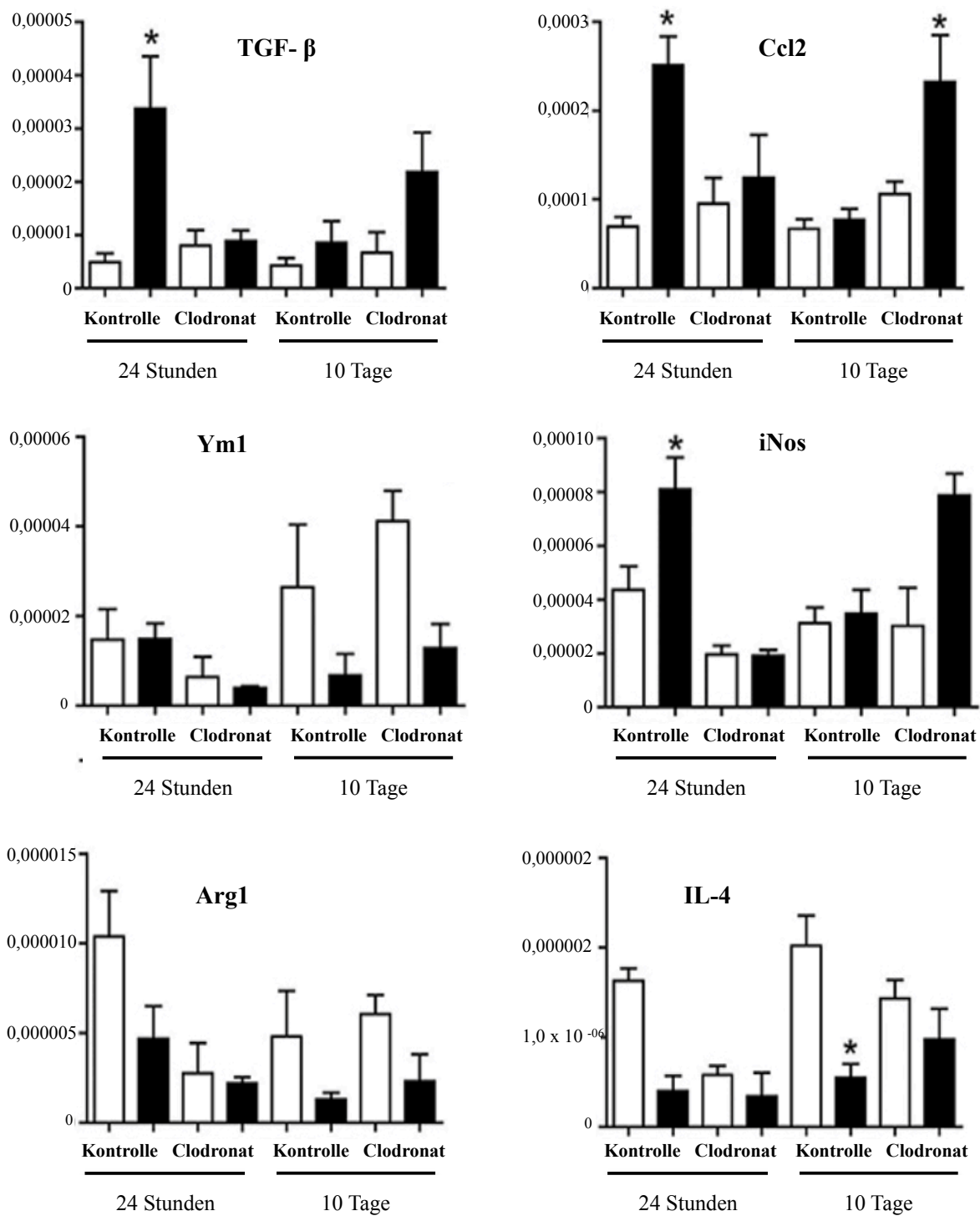


Abbildung 13d: Erhöhte Entzündungsparameter sowie Prädominanz der proinflammatorischen M1-Makrophagen in der IRF4-defizienten Niere. Nach intravenöser Injektion von Kontroll-Liposomen bzw. Clodronat wurde die 45-minütige unilaterale IR an Wildtyp-Mäusen und IRF4-defizienten Mäusen durchgeführt. Nach zehn Tagen wurden M1- bzw. M2-Makrophagen-typische Zytokine und Chemokine bestimmt. In jeder Gruppe waren mindestens fünf Versuchstiere, deren Werte gemittelt wurden (\pm SEM). Die Clodronatbehandlung verhindert die renale Inflammation im IRF4-knockout-Modell. Weiss: Wildtyp; schwarz: IRF4-Knockout; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Um den Makrophagensubtyp weiter zu spezifizieren wurden in einem nächsten Schritt die intrarenalen Level an M1- und M2-Makrophagen-typischen Zytokinen und Chemokinen untersucht. 12 Stunden nach LPS-Stimulation zeigten sich erhöhte intrarenale Level von M1-Makrophagen-typischen Markern. Im Gegensatz dazu fanden sich keine erhöhten Marker von alternativ-aktivierten M2-Makrophagen. Während der akuten Phase hingegen waren die Zytokinlevel bei IRF4-defizienten- und Wildtyp-Tieren gleich (Abbildung 14).

Als Nächstes wurde untersucht, ob das Überwiegen der proinflammatorischen M1-Makrophagen in IRF4-defizienten Tieren verglichen mit Wildtyp-Tieren ein verändertes systemisches Zytokinmilieu bedingt. M1-Makrophagen sezernieren typischerweise IP10, IL-12, IL-6 und TNF- α , während M2-Makrophagen hauptsächlich Th2-polarisierende Zytokine wie IL-4 sekretieren. IRF4-/-Tieren und Wildtyp-Mäusen wurde LPS injiziert. Nach 12 Stunden wurden die Tiere getötet und die systemischen Zytokinreaktionen im Plasma untersucht. Im Vergleich zu Wildtyptieren, zeigten IRF4-defiziente Tiere höhere Plasmaspiegel von M1-Makrophagen-typischen Zytokinen: Die Plasmaspiegel von *IL-6* waren tendenziell erhöht. Die Expression von *IL-12p70*, *INF-gamma* sowie *TNF-alpha* war hingegen signifikant erhöht (Abbildung 14). Im Gegensatz dazu wurden niedrige Plasmaspiegel für das M2-Makrophagen-typische Zytokin *IL-4* nachgewiesen.

Der IRF4-Mangel fördert somit die systemische M1-Makrophagen-dominante Inflammation nach TLR-Aktivierung durch LPS-Stimulation.

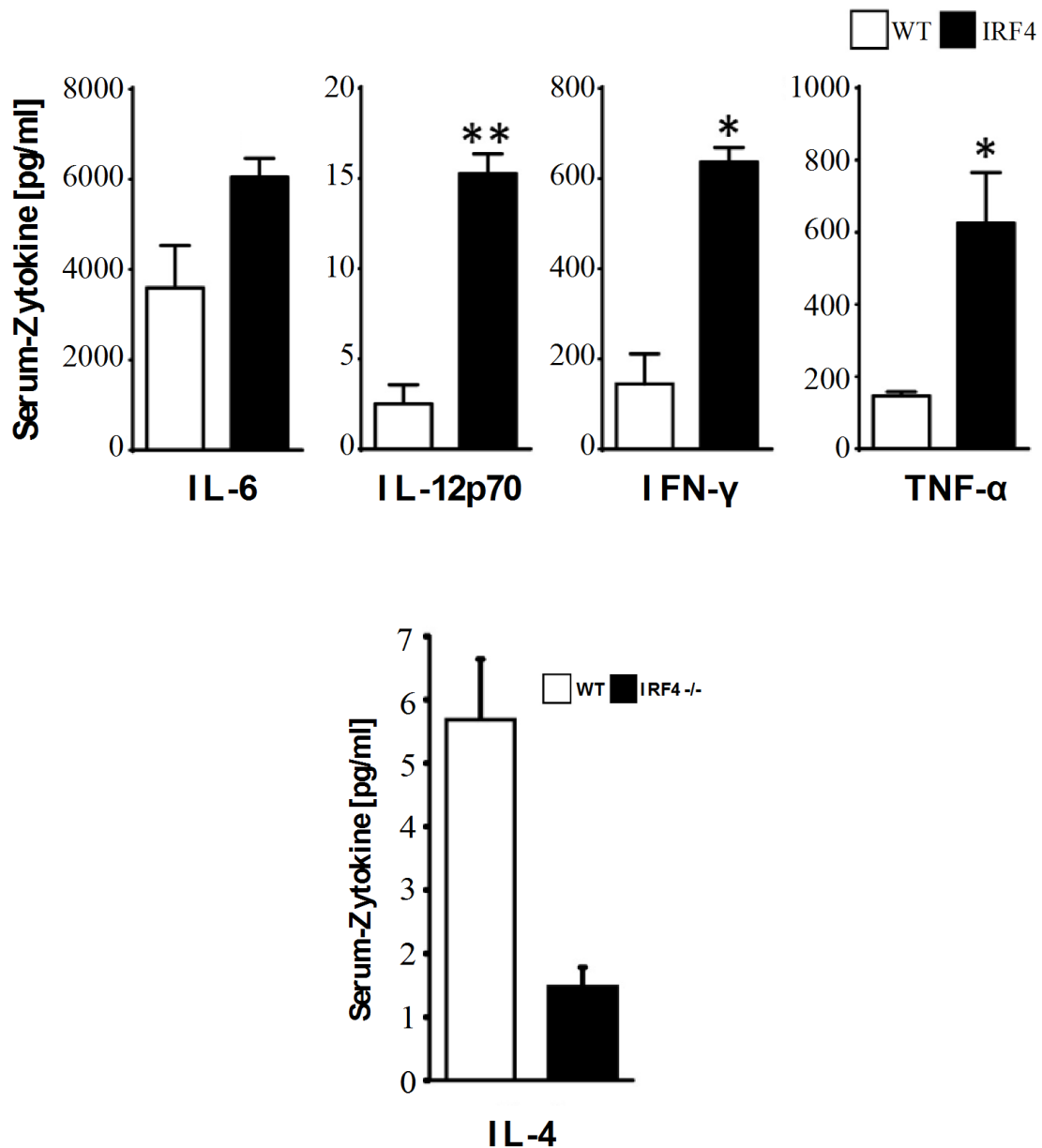


Abbildung 14: Induktion proinflammatorischer M1-Makrophagen-spezifischer systemischer Marker in der akuten Phase nach LPS-Stimulation. 12 Stunden nach LPS-Stimulation wurden systemische M1-Makrophagen-spezifische Marker im Serum von IRF4-defizienten- und Wildtyp-Tieren bestimmt. Zunächst wurde die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurde diese mit Hilfe von RT-PCR quantifiziert. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression der M1-Makrophagen-spezifischer Zytokine IL-12p70, IFN-gamma und TNF-alpha im IRF4-defizienten Tiere im Vergleich zum Wildtyp. Daneben war die IL-6-Expression bei den IRF4-knockout Tieren erhöht. Dem gegenüber zeigten sich in der IRF4-defizienten Niere niedrige Plasmaspiegel für das M2-Makrophagen-typische Zytokin IL-4, verglichen mit der Wildtyp-Niere. Dies deutet möglicherweise auf eine eingeschränkte M2-anti-inflammatorische Reaktion im IRF4-defizienten Tier hin. Die Daten sind als Mittelwert der spezifischen mRNA/18s rRNA \pm SEM gegenüber den C57BL6-Mäusen dargestellt. Weiss: Wildtypier; schwarz: IRF4-Knockouttier; *p<0,05, **p<0,01.

Nun wurde untersucht, ob auch in der postischämischen Niere eine M1-Makrophagen-prädominante Entzündungsreaktion vorherrscht. Hierfür wurden M1- und M2-spezifische Expressionsmarker von Wildtyp- und IRF4-defizienten Mäusen im Modell des CAANV nach IR bestimmt. 3 Wochen nach unilateraler IR wurden aus den Nieren der Wildtyp-Tiere und der IRF4-defizienten Tiere CD11b⁺ Makrophagen mittels MACs-Beads isoliert. Daraufhin wurde aus den CD11b⁺ Immunzellen die mRNA isoliert. Diese wurde im Anschluss in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe von RT-PCR quantifiziert. Makrophagen der IRF4-knockout-Tiere zeigten verglichen mit den Makrophagen der Wildtyp-Tiere eine signifikant erhöhte Expression der mRNA von M1-Makrophagen-typischen Zytokinen, wie *TNF-alpha*, *iNOS*, *IFN-gamma* und *CCL2*. In Übereinstimmung mit den vorherigen Untersuchungen zeigte sich eine reduzierte Expression von M2-Makrophagen-typischen Mediatoren wie *Arg1*, *Ym1*, *Fizz1* und *IL4* in den CD11b⁺ Zellen (Abbildung 15). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass IRF4 den Aktivierungsgrad und die Differenzierung von Makrophagen beeinflusst. Bei IRF4-Defizienz sind in der postischämischen Niere mehr proentzündliche M1-Makrophagen und weniger antiinflammatorische M2-Makrophagen vorhanden. Bei IRF4-Defizienz besteht das Unvermögen der Makrophagenpolarisierung vom proinflammatorischen zum antiinflammatorischen Phänotyp. Dies könnte erklären, warum es bei IRF4-defizienten Tieren zur Persistenz der akuten Entzündungsreaktion, dem damit verbundenen Zellschaden und der Unfähigkeit der Geweberegeneration kommt.

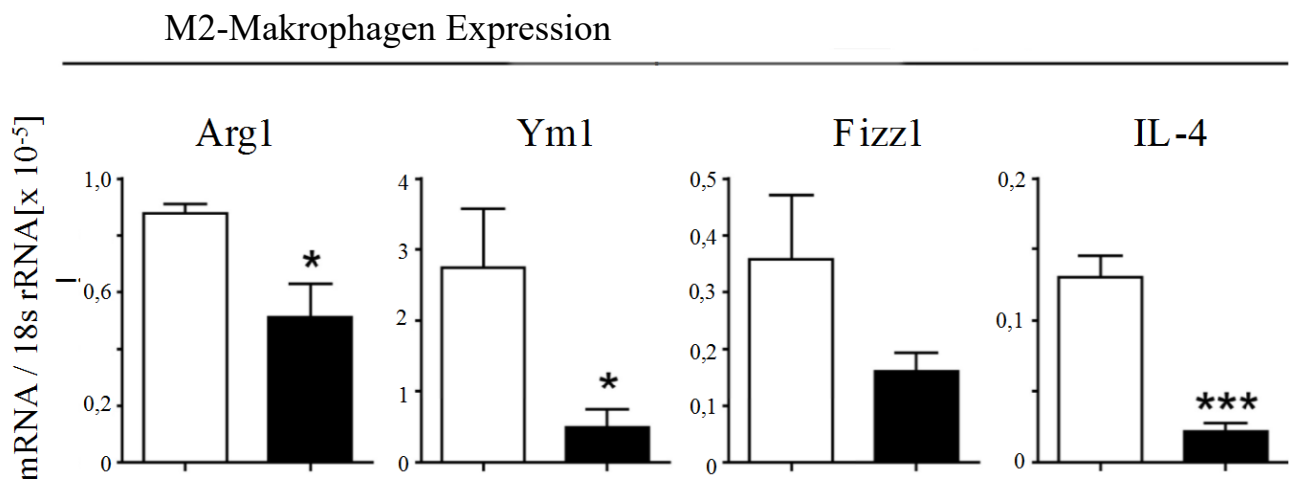
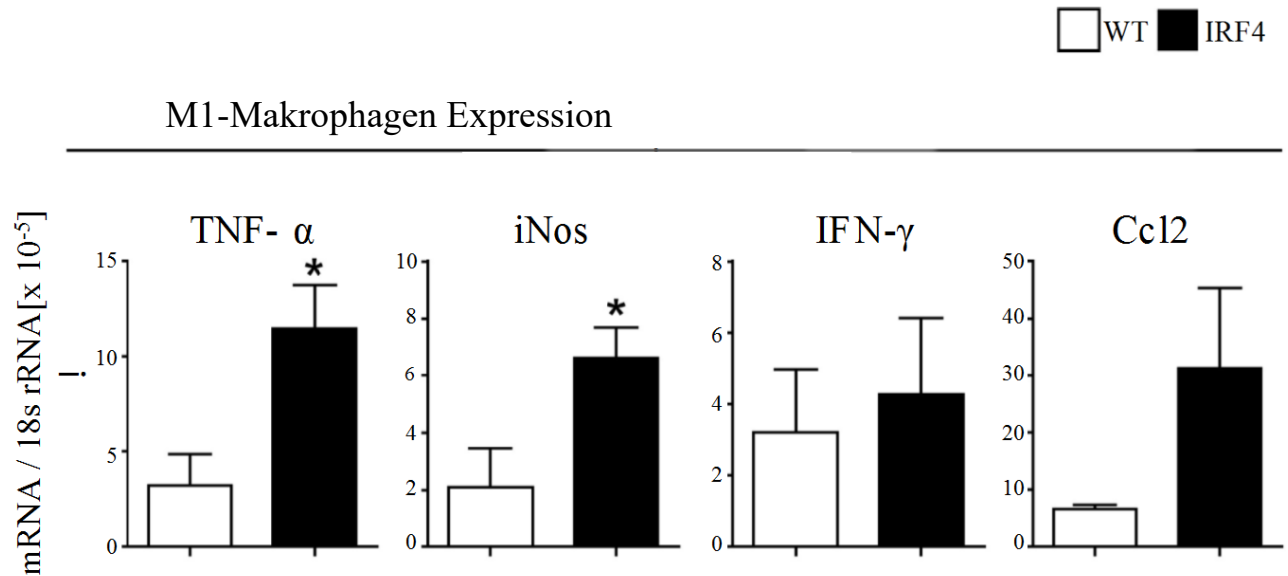


Abbildung 15: mRNA Expression von M1- und M2-typischen Markern in CD11b⁺ Immunzellen nach Ischämie-Reperfusion. 21 Tage nach unilateraler Ischämie-Reperfusion wurden bei IRF4^{-/-} und IRF4^{+/+} die Nieren entnommen. Im Anschluss wurden die CD11b⁺ Immunzellen mit Hilfe von MACS-Beads aus den entnommenen Nieren isoliert. Daraufhin wurden die darin enthaltene mRNA mit quantitativer RT-PCR quantifiziert. Die CD11b⁺ Zellen aus den postischämischen Nieren der IRF4-knockout Mäuse zeigten verglichen mit den Wildtyp-Tieren eine signifikante Erhöhung der Expression an *TNF- α* und *iNOS*. Daneben war die Expression von *INF-gamma* und *CCL2* bei den IRF4-knockout Tieren erhöht. Die Expression von *Arginase-1*, *Ym1* und *IL-4* war in der IRF4-defizienten Niere im Vergleich zu den Nieren der Wildtyp-Tieren signifikant erniedrigt. Auch die Expression von *Fizz1* war in den IRF4-defizienten Mäusen schwächer als im IRF4^{+/+} Tier. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM. Die spezifische mRNA/18s rRNA der IRF4^{+/+} Tiere ist angegeben als 100 Prozent. Die spezifische mRNA/18s rRNA der IRF4^{-/-} Tiere ist als prozentuale Abweichung davon dargestellt. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

IRF4 ist ein negativer Regulator in der chronischen Entzündungsphase nach hypoxischer Nierenschädigung und spielt eine entscheidende Rolle in der Makrophagen-gesteuerten Immunreaktion. Keinen Einfluss hingegen scheint IRF4 auf die Regeneration, die Proliferation oder den Zelltod von tubulären Epithelzellen zu haben. IRF4-Defizienz bedingt eine Nierenschädigung in der akuten Phase nach IR durch das Ausbleiben der Begrenzung einer M1-Makrophagen-prädominanten Hyperinflammation. Auch im Modell des CAANV führt die IRF4-Defizienz zur Nierenfunktionseinschränkung mit einer kontinuierlich erhöhten Inflammation.

Um zu zeigen, dass eine verstärkte Nierenschädigung bei IRF4-Defizienz auch unabhängig von der akuten Inflammation stattfindet, haben wir die primäre zelluläre Immunreaktion nach IR mittels Gabe von Clodronat unterdrückt. Trotz Clodronatgabe zeigte sich in der chronischen Phase nach IR bei den IRF4-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtyptieren eine verstärkte Nierenschädigung und vermehrte Makrophagenmigration.

Diese Experimente zeigen, dass der Gewebeumbau nach hypoxischer Nierenschädigung durch die IRF4-bedingte Modulation von Makrophagen beeinflusst wird.

Kapitel 4

Diskussion

4 Diskussion

Heutzutage bleiben die genauen pathophysiologischen Vorgänge nach akuter Nierenschädigung weiterhin nicht gänzlich geklärt. Es ist jedoch eindeutig, dass die Schädigung in Form von Ischämie und Reperfusion die Nierenfunktion einschränkt und sich mit einer speziellen klinischen Charakteristik präsentiert. Entscheidend für die Progression zur verstärkten Schädigung nach renaler IR ist die Dysfunktion des Endothels, die durch viele Faktoren verschlechtert wird und in einem Circulus vitiosus endet, der die Nierenperfusion beeinträchtigt und zur verlängerten Hypoxie führt. Vor allem die frühe Phase nach Ischämie mit der Aktivierung des Immunsystems und der folgenden Entzündungsreaktion nehmen hierbei großen Einfluss auf die Heilung, Regeneration oder mögliche Funktionseinschränkung nach renaler Ischämie. Nach Reperfusion des ischämischen Gewebes bedingt besonders das angeborene Immunsystem die weitere Schädigung und spielt, durch die hervorgerufene Entzündungsreaktion, eine entscheidende Rolle bei der eventuellen Entwicklung eines CAANV. Das geschädigte Nierengewebe setzt Moleküle frei, die zur Aktivierung von TLRs und zur Bildung von proinflammatorischen Mediatoren führen. Diese Inflammationsreaktion wird v. a. durch Zytokine und Immunzellen bestimmt. Neben einer Vielzahl von Immunzellen sind es v. a. Makrophagen, die chronische Entzündungsprozesse regulieren [124]. Andere immunologisch wirksame Zellen, wie die T-Helfer-Zeller, sezernieren Zytokine, die die Makrophagenpolarisierung bestimmen und profibrotisch bzw. antifibrotisch wirken. Th2-Zellen sezernieren profibrotische Zytokine, wie IL4 sowie IL5 und induzieren damit bspw. die Leberfibrosierung. Zytokine der Th1-Zellen hingegen wirken antifibrotisch [124].

Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass Regulatoren, die die Polarisierung von proinflammatorischen M1-Makrophagen und profibrotischen M2-Makrophagen beeinflussen sowohl in der akuten Entzündungsreaktion also auch in der chronischen Entzündung eine wichtige Rolle spielen.

Durch Interaktion und Hemmung des TLR-MyD88-Signalwegs ist der immunmodulatorische Faktor IRF4 ein Suppressor der angeborenen Immunität [77]. In der akuten Phase nach hypoxischem Nierenschaden schützt IRF4 vor einer übersteigerten akuten Entzündungsreaktion. Daneben wirkt IRF4 als endogener Regulator der myeloischen Zellaktivierung, d. h. den dendritischen Zellen, unterdrückt die Freisetzung von TNF-alpha aus der Niere und begrenzt so die tubuläre Zellnekrose, Gewebeentzündung und das akute Nierenversagen 24 Stunden nach IRI [112]. IRF4-Defizienz hingegen bedingt in der akuten Phase nach IRI Hyperinflammation und ein M1-Makrophagen-prädominantes Milieu, das zu vermehrter Nierenschädigung führt [112]. Nach

Ischämie-Reperfusion hat IRF4 die Aufgabe die akute inflammatorische Reaktion einzudämmen. Die systematische Aufgabe von IRF4 in der chronischen Phase nach IRI kann jedoch aus bestehenden Daten nicht abgeleitet werden. Aufgrund seiner Rolle in der Pathogenese verschiedener chronischer Entzündungskrankheiten, wie der Atherosklerose oder der Lupusnephritis [125], seiner starken immunmodulatorischen Funktion und seiner Rolle bei der Differenzierung myeloischer Zellen, haben wir eine funktionelle Beteiligung von IRF4 in der Pathophysiologie des CAANV angenommen. Die Hypothese der hier vorliegenden Arbeit war, dass die durch IRF4 bedingte Inaktivierung von proinflammatorischen Makrophagen für die Beendigung der renalen Entzündungsreaktion benötigt wird, um eine vollständige renale Regeneration nach akuter Nierenschädigung zu gewährleisten.

Um die genaue Funktion von IRF4 bei der Entstehung eines CAANV zu untersuchen, haben wir die Nieren von IRF4-defizienten und Wildtyp-Mäusen im Langzeitverlauf nach Ischämie-Reperfusion untersucht. Wir induzierten eine akute Nierenschädigung und untersuchten die Nieren bis hin zu fünf Wochen nach der Operation. Unsere Daten zeigen, dass IRF4 die Regeneration nach akuter Nierenschädigung fördert, indem es die Ausbildung von Nierenfibrose und die Progression zum CNV unterdrückt. Dabei führt IRF4 in der chronischen Phase nach akuter Nierenschädigung zur Polarisierung der Makrophagen vom proinflammatorischen Typ M1 zum alternativ aktivierten Typ M2.

In unseren Untersuchungen zeigten wir, dass die IRF4-Defizienz zu einer persistierenden Aktivierung von proinflammatorischen Makrophagen führt. Dies hat die Entwicklung eines chronischen Nierenversagens zur Folge. Histopathologisch zeigt sich eine tubuläre Atrophie, eine erhöhte Dichte an Glomeruli und eine vermehrte Fibrosierung des renalen Gewebes. Als typische Kennzeichen einer chronischen Nierenentzündung gelten die interstitielle Fibrosierung sowie die vaskuläre und tubuläre Atrophie [103]. Somit schlussfolgern wir, dass es in den postischämischen IRF4-knockout-Mäusen zu einem CAANV gekommen ist. In dieser Arbeit konnte somit in einem experimentellen Tierversuch der kausale Zusammenhang zwischen einer hypoxischen akuten Nierenschädigung und der nachfolgenden Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz hergestellt werden. Wir konnten zeigen, dass die durch Makrophagen vermittelte Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle in der Pathogenese des CAANV spielt.

Inflammation in der Pathogenese des CAANV

Ko et al. zeigten im Modell der unilateraler Nephrektomie mit kontralateraler Ischämie-Reperfusion, dass es nach akuter Nierenschädigung zur Entwicklung einer chronischen

Niereninsuffizienz kommt. Ein bis zwei Monate nach Ischämie-Reperfusion entwickelten die Versuchstiere ein chronisches Nierenversagen mit erhöhten Nierenretentionsparametern, tubulärer Atrophie, interstitieller Fibrosebildung, einer verstärkten Expression proentzündlicher Zytokine und andauernder Makrophageninfiltration. Mittels Clodronat wurden ab dem dritten Tag nach der IR-Operation die Makrophagen systemisch depletiert. Daraufhin besserte sich der Phänotyp und das Ausmaß der chronischen Nierenschädigung [126]. In Übereinstimmung zu diesen Beobachtungen bestätigte unsere Versuchsreihe, dass die chronisch-insuffizienten Nieren der IRF4-knockout Mäuse fünf Wochen nach dem akuten Nierenversagen verkleinert waren und signifikant an Gewicht verloren hatten. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass es zu einem signifikanten Verlust an TECs und einer Prädominanz von M1-Makrophagen kam. Zudem konnten wir eine signifikante Zunahme der Retentionsparameter nachweisen. Somit hat die beteiligte Entzündungsreaktion Anteil an der Entwicklung des CAANV. Des Weiteren konnte belegt werden, dass Makrophagen dabei wichtige Vermittler sind. Neben der Entzündungsreaktion wird auch die vaskuläre Atrophie als Ursache für die Entwicklung eines CAANV diskutiert. So zeigten *Basile et al.*, dass es in Nieren von Ratten nach hypoxischer Nierenschädigung und 40-wöchiger Reperfusion zu einem Verlust von peritubulären Kapillaren im inneren Streifen der äußeren Medulla kommt. Daneben kam es zu vermehrter renalen Fibrosierung und Proteinurie [127]. Aufgrund der verminderten vaskulären Versorgung kommt es zur chronischen Hypoxie, die wiederum die Entzündung bedingt [51].

Der Einfluss von IRF4 auf die Entzündungsreaktion

In unseren Untersuchungen kam es bei IRF4-defizienten Tieren fünf Wochen nach ischämischer Nierenschädigung zu einer anhaltend hohen Expression von Entzündungsmarkern sowie Markern der renalen Schädigung. Daneben zeigte sich eine Prädominanz von proinflammatorischen M1-Makrophagen. Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass es in den postischämischen Nieren durch den Verlust von IRF4 zu einer andauernden Entzündungsreaktion kommt. IRF4 ist von großer Bedeutung für das Gleichgewicht der physiologischen Körperfunktion. IRF4-Defizienz führt zu Pathologien, die zum Teil mit chronischen Entzündungsreaktionen assoziiert sind. So wurde in einem Mausmodell der chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED) gezeigt, dass über die NOD2-Aktivierung mit Muramidyl-Dipeptiden, als Bestandteile von Bakterien, die Expression von IRF4 zunimmt und die schädliche TLR-vermittelte Entzündungsreaktion reduziert wird. Bei IRF4-Defizienz hingegen kam es zur Verstärkung der CED [79].

Im Modell der TNBS-induzierten Kolitis wirkt IRF4 in der Akutphase aktivierend auf die

Immunantwort, in der chronischen Krankheitsphase unterdrückt es jedoch den Entzündungsprozess. Dementsprechend kam es im IRF4-Knockout zu einer chronischen Entzündungsreaktion [128]. Die Deaktivierung von proentzündlichen M1-Makrophagen durch IRF4 ist außerdem von großer Bedeutung für die relative Immunsuppression im Rahmen einer Sepsis. So leiden IRF4-defiziente Mäuse an einer höheren Anfälligkeit für einen septischen Schock. Die IRF4-Defizienz ist daneben mit einer erhöhten Autoimmunität assoziiert. So beschrieb *Bravo* 2018 in einem case-Report die Folgen der hereditären IRF4-Defizienz im Menschen [77, 129].

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die IRF4-knockout Mäuse ein CAANV entwickeln. Somit verhindert die Deaktivierung proinflammatorischer Makrophagen die Entwicklung einer chronischen Entzündungsreaktion und ermöglicht die Geweberegeneration.

Das Auflösen der akuten Entzündungsreaktion nach Ischämie-Reperfusion ist dabei kein passiver Vorgang, sondern ein aktiver Prozess, welcher durch die Induktion verschiedener regulatorischer Gene kontrolliert wird. Das Ausmaß der akuten inflammatorischen Reaktion nach IR korreliert jedoch nicht zwangsläufig mit dem späteren Grad der Fibrosierung und der Wahrscheinlichkeit ein CNV zu entwickeln [123, 130, 131]. So hatte bspw. der immunmodulierende Faktor *single Ig IL-1 receptor-related protein* (SIGIRR), der die akute Entzündungsreaktion begrenzt, keinen Einfluss auf die Entwicklung eines CAANV. SIGIRR deaktiviert durch Inhibition der TLR-Signalübertragung DCs und reduziert die renale CXCL2/MIP2-Expression, die Leukozytenmigration sowie die tubuläre Epithelzellennekrose nach IRI. Im Modell der unilateralen Obstruktion des Urethers hatte es keinen Einfluss auf die Fibroseinduktion [130, 131]. Umgekehrt hatte das immunmodulierende Molekül IRAK-M 24 Stunden nach IRI keinen Einfluss auf die akute Inflammation. Dennoch konnte gezeigt werden, dass IRAK-M fünf Wochen nach Ischämie-Reperfusion vor Fibrosierung schützt. So kam es bei IRAK-M-defizienten Mäusen nach IRI zur dauerhaften Präsenz von proinflammatorischen Makrophagen. Dies hat die Entwicklung einer chronischen Nierenschädigung mit Atrophie der renalen Tubuli, einer erhöhten Dichte atubulärer Glomeruli und einer Akkumulation von extrazellulärer Matrix zur Folge [123]. IRAK-M spielt somit v. a. in der Phase der Regeneration eine Rolle. Es wird im Wesentlichen in Makrophagen exprimiert, die in der Heilungsphase die Inflammation begrenzen. Da auch IRF4 in DCs, aber v. a. auch in Makrophagen exprimiert wird und hier ein wichtiger Vermittler der Makrophagenpolarisierung ist, haben wir angenommen, dass die IRF4-bedingte Regulation von Makrophagen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des CAANV spielt.

In unseren Experimenten konnte eine überschießende akute Entzündungsreaktion nach IRI bei

IRF4-defizienten Mäusen mittels Depletion von Makrophagen mit Clodronat unterdrückt werden. Interessanterweise zeigten die mit Clodronat behandelten IRF4-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren in der Spätphase nach IRI, trotz einer unauffälligen initialen Entzündungsreaktion, eine vermehrte Makrophagenmigration mit erhöhter intrarenaler mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine und einer verstärkten Nierenschädigung.

Somit wirkt IRF4 einerseits in der Akutphase der Entzündung. Es wirkt jedoch auch unabhängig vom initialen akuten Entzündungsgeschehen in der chronischen Phase der Entzündung. Auch in murinen Schlaganfallmodellen, bei denen IRF4 das neuronale Überleben fördert, erreichte die IRF4-Expression erst 72 Stunden nach der Ischämieinduktion ihren Höhepunkt [122]. In Übereinstimmung zeigten IRF4-defiziente Mäuse in unseren Untersuchungen eine gesteigerte mRNA-Expression von proentzündlichen Zytokinen sowie gesteigerte Level an Nierenmakrophagen fünf Wochen nach IRI. In der chronischen Phase nach IRI bedingt dies eine kontinuierliche Entzündungsreaktion sowie das Unvermögen diese einzugrenzen. Untersuchungen zur CED unterstützen diese Theorie. So zeigten *Mudter et al.*, dass IRF4 auch im Modell der TNBS-induzierten Kolitis in der Akutphase aktivierend auf die Immunantwort wirkt. In der chronischen Krankheitsphase unterdrückt es jedoch den Entzündungsprozess und den Progress zum chronischen Krankheitsbild [128]. Zusammenfassend deuten diese Daten auf eine Rolle von IRF4 bei der Wundheilung in der akuten Phase nach der Verletzung und in der Kontrolle chronischer Entzündungen hin. Neben den anderen Negativregulatoren ist IRF4 somit ein wichtiger Mediator für die Wiederherstellung der Homöostase des Nierengewebes nach Ischämie-Reperfusion, indem es zur Deaktivierung von proinflammatorischen Makrophagen führt.

Die Rolle von proinflammatorischen Makrophagen für die Wundheilung

Zur Aufrechterhaltung der Homöostase nach Gewebeschädigung werden eine Reihe von Reaktionen begonnen, die den Schaden begrenzen sollen [106]. Häufig dient die kutane Wundheilung als Modell für Heilung, wobei mehrere überlappende Phasen unterschieden werden. Der erste Abschnitt ist die Entzündungsphase. Hier kommt es zur Rekrutierung von immunaktiven Zellen. Diese synthetisieren proentzündliche Chemokine, Zytokine und ROS und eliminieren Pathogene sowie nekrotische Zellen. Als Nächstes folgt die Wachstumsphase. Hier kommt es zur Proliferation und Aktivierung von Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Es folgt die Reepithelialisierung, Neoangiogenese und Produktion einer vorübergehenden extrazellulären Matrix, die als Unterstützung für das Gewebe dient. Als Letztes folgt die Phase der Beendigung der Entzündungsreaktion mit der Wiederherstellung der Gewebeintegrität [132].

Dieser skizzierte Ablauf der Wundheilung dient in erster Linie dem Überleben des Organismus bei Verletzungen. Im Rahmen von Reparaturvorgängen kann es jedoch auch zu einer unkontrollierten und exzessiven Synthese von extrazellulärer Matrix mit Fibrosebildung und Funktionsverlust des Gewebes kommen [133]. Die Reparaturprozesse sind, ausgenommen in der frühen Embryonalphase, stets mit einer Entzündung verbunden. Bei unkontrollierter Progression der Inflammation kann es zum Fortschreiten der Narbenbildung kommen. Dies führt letztendlich zum Verlust der Gewebefunktion.

In unseren Untersuchungen zeigte sich, dass es im Modell des CNV nach IR bei IRF4-Defizienz zu einer Persistenz von proinflammatorischen M1-Makrophagen kommt. Daraus ergibt sich eine chronische Entzündungsreaktion mit tubulärer Atrophie, verminderter Heilung des Gewebes und vermehrter interstitieller Fibrosebildung.

Auch im Modell der kutanen Heilung zeigte sich, dass eine persistierende durch Makrophagen vermittelte Entzündung zu einer Beeinträchtigung der Regeneration von Gewebe führt. *Sindrilaru et al.* zeigten z. B., dass es bei chronisch venösen Ulzera zu einer persistierenden M1-Makrophagen-prädominanten Entzündungsreaktion kommt. Grund für die M1-Makrophagen-Prädominanz war die Akkumulation von Eisen in M1-Makrophagen, das diese wiederum aktivierte. Diese proentzündlichen Makrophagen führten zu ausgeprägten Schäden der DNA und einer frühzeitigen Alterung der kutanen Fibroblasten, was eine verschlechterte Wundheilung der Haut bedingt. Die Blockade von TNF- α , dem proinflammatorischen und proapoptotischen Hauptprodukt der M1-Makrophagen, mittels Etanercept, verbesserte den Heilungsprozess [134].

In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen, kam es in unseren Untersuchungen zur chronischen Entzündung nach akuter Nierenschädigung beim IRF4-knockout-Tier auch zu einer Akkumulation von M1-Makrophagen. IRF4 hat, neben der Aufgabe der Makrophagenpolarisation, eine Vielzahl von immunmodulatorischen Funktionen. Im adaptiven Immunsystem oder bei chronischen Entzündungen ist IRF4 zur Differenzierung der Th2-Effektorfunktionen sowie der Treg- und Th17-Differenzierung erforderlich [88, 135, 136]. Darüber hinaus wurde bei IRF4-defizienten Mäusen von tiefgreifenden Veränderungen der systemischen Zytokinreaktionen berichtet. Unter anderem kommt es zu einer verminderten Sekretion von Th2-Zytokinen, IL-17 und IL-21 durch T-Zellen [88, 137-139]. Bei der Injektion mit LPS zeigten IRF4-/- Mäuse eine deutliche Überproduktion von M1-Makrophagen-spezifischen Markern, wie IL-12, TNF- α , IFN- γ und IL-10. Dagegen stellten wir niedrigere systemische IL4-Werte fest, einem M2-Makrophagentypischen Marker. Dies ging einher mit einer vorherrschenden systemischen Th1- versus Th2-

Reaktion. Wir konnten ferner zeigen, dass bei IRF4-defizienten Mäusen nach Stimulation mit M1-Polarisationsmitteln, wie LPS und IFN γ , vermehrt klassische bzw. proinflammatorische M1-Makrophagen vorliegen.

In chronisch entzündeten Nieren von IRF4-defizienten Mäusen zeigte sich eine Prädominanz von M1-Makrophagen. Dies liegt an (a) M2-Polarisationsfehlern von IRF4-Makrophagen und (b) einem eher für M1-Makrophagen typischen systemischen Zytokinmilieu. Das Überwiegen der M1-Makrophagen fünf Wochen nach IRI ging mit der chronischen Entzündungsreaktion, dem Verlust von TECs und renaler Fibrosierung einher.

Wir nehmen an, dass die Prädominanz der M1-Makrophagen die andauernde renale Inflammation in unserem Mausmodell bedingt. Diese wiederum bewirkt die chronische Nierenschädigung und damit das CAANV. Diese Annahme stützt sich auf folgende Beobachtungen: (a) IRF4 wird v. a. in Immunzellen exprimiert; (b) fünf Wochen nach IRI finden sich v. a. M1-Makrophagen im renalen Gewebe und es kommt zur übersteigerten renalen Entzündungsreaktion; (c) Schließlich kommt es bei IRF4-defizienten Mäusen, trotz der Depletion von Makrophagen mittels Clodronate in der akuten Phase nach IRI, zur chronisch renalen Hyperinflammation.

Unsere Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse anderer Untersuchungen. So führte bspw. Im Modell der Adriamycin-induzierten chronischen Nephropathie die Übertragung (adoptiver transfer) von M1-Makrophagen zu einem signifikant erhöhten Krankheitsprogress [108].

Interessanterweise hat die Stimulation von BMDMs mit vitalen oder hypoxischen tubulären Epithelzellen per se keine starke Aktivierung von Makrophagen hervorgerufen. Dies deutet darauf hin, dass eher das systemische Zytokin-Milieu, als die lokale Makrophagen-DAMP-Interaktion, diese renale Makrophagenpolarisation zum M1-Phänotyp bestimmen könnte.

Im Gegensatz zu Modellen der ischämischen Hirnverletzung [10], konnten wir keine Auswirkungen von IRF4 auf die Stressresistenz und proliferative Reaktion von renalen tubulären Epithelzellen feststellen. *Lee et al.* konnten jedoch zeigen, dass M1-Makrophagen die Regeneration von TECs hemmen, was auch für dafür spricht, dass die M1-Makrophagen-prädominante Entzündungsreaktion zur Ausbildung eines CAANV führt [105].

Ursachen der renalen Fibrosierung im CAANV

Im chronischen Verlauf nach akuter ischämischer Nierenschädigung zeigte sich in unseren Untersuchungen eine signifikant erhöhte Fibrosierung der operierten Niere des IRF4-defizienten

Tiers. Die kontralaterale Niere hypertrophierte kompensatorisch, um dem Gewebeverlust und damit dem renalen Funktionsverlust entgegenzuwirken. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg Fibrose-spezifischer mRNA, wie TGF- β , Fibronectin, Kollagen 1a und FSP1 im IRF4-knockout Tier. Auch die histologische Auswertung der postischämischen Nierenschnitte bestätigte die vermehrte renale Fibrosierung bei IRF4-Defizienz. Es kam zur signifikant vermehrten Akkumulation von extrazellulärer Matrix. Die voranschreitende Vernarbung ist, unabhängig von der Ätiologie, ein gemeinsames Kennzeichen der chronischen Nierenerkrankung und bedingt als letzte Konsequenz das terminale Nierenversagen [140]. Ungeklärt bleibt der zeitliche Ablauf von renaler Inflammation sowie interstitieller Fibrosierung und ob die Überproduktion von Fibrose aktiv das chronische Nierenversagen fördert oder begleitend zu dieser auftritt. Eine Annahme ist, dass bei der Vermittlung renaler Entzündung und Fibrose, Makrophagen eine große Rolle spielen [103]. Sobald Makrophagen in Kontakt mit IL-4 und IL-13 kommen, schütten sie profibrotische Mediatoren, wie PDGF und TGF- β aus. Daneben synthetisieren sie Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel Fibronectin [104]. TGF- β ist ein bedeutender Vermittler für die Fibrosebildung. So induziert TGF- β die Myofibroblasten- und Fibroblastenproliferation und bedingt die Produktion extrazellulärer Matrix [141]. *Nishida et al.* bezeichnet daher M2-Makrophagen als die Vermittler für die progressive Fibrosierung [142]. Unsere Untersuchungen zeigten, dass die atrophischen Nieren der IRF4-knockout Mäuse und die Wildtyp-Nieren in der chronischen Phase nach akuter Nierenschädigung keine Unterschiede in der Expression profibrotischer, M2-Makrophagen-typischer Markern aufweisen: In den IRF4-defizienten Nieren lag dieselbe Anzahl an profibrotischen M2-Makrophagen, wie in den Wildtyp-Nieren, vor. Somit wird die vermehrte Fibrosebildung der IRF4-defizienten Nieren nicht durch M2-Makrophagen verursacht. Als ursächlich für die Entwicklung der Fibrose in IRF4-defizienten Tieren sahen wir vielmehr das vermehrte Vorkommen proentzündlicher M1-Makrophagen, welches eine verstärkte initiale Entzündungsreaktion in den postischämischen Nieren hervorruft und damit zu einer fehlenden Proliferation des verletzten Epithels führt. Eine wichtige Komponente des Heilungsprozesses nach akuter Nierenschädigung ist die Fähigkeit tubulärer Epithelzellen zugrunde gegangene Zellen durch Proliferation zu ersetzen [143]. In unseren Untersuchungen kam es aufgrund der unzureichenden epithelialen Heilungsprozesse und der andauernden Entzündung, zu einer Reparatur der tubulären Defekte mittels Fibrosierung, da die Regeneration der Niere nicht möglich war. Diese mesenchymale Heilung durch Vernarbung führte zur Verkleinerung von Wundflächen und damit zur Gewebestabilisierung [106]. Es konnte gezeigt werden, dass proximale Tubulusepithelzellen nach unilateraler Ischämie-Reperfusion im Stadium G2/M des

Zellzyklus verharren. Anstelle der physiologischen Reparaturvorgänge, kommt es zu einer verstärkten Synthese der profibrotischen Wachstumsfaktoren CTGF und TGF- β . Diese führen zu einer Proliferation von Fibroblasten und einer Überproduktion an extrazellulärer Matrix, die die Progredienz der Nierenfibrosierung bedingt [144].

In unseren Untersuchungen ist nicht die durch alternativ-aktivierte M2-Makrophagen vermittelte Nierenfibrosierung ursächlich für das CAANV, sondern die anhaltende Entzündungsreaktion. Diese wird durch proinflammatorische M1-Makrophagen vermittelt, verhindert eine tubuläre Heilung und führt sekundär zur Akkumulation von extrazellulärer Matrix. Auch andere Studien bestätigen unsere Beobachtungen. So zeigten *Wang et al.*, dass M1-Makrophagen zu stärkeren Parenchymschäden und vermehrter Fibrosierung im Langzeitverlauf nach akuter Nierenschädigung führen. Makrophagen wurden ex vivo zu M1- bzw. M2-Makrophagen programmiert, in Mäuse mit Adriamycin-induzierter akuter Nierenschädigung injiziert und der Grad der Fibrosierung nach vier Wochen bestimmt. Wurden M1-Makrophagen injiziert kam es zu mehr Gewebeschaden und Vernarbung. Bei Injektion von M2-Makrophagen hingegen kam es zu weniger renalem Schaden und weniger Fibrosierung [108].

Nach akuter Nierenschädigung kommt es somit zum Nephronverlust. TECs gehen zugrunde und die Dichte an atubulären Glomeruli nimmt zu. Im Rahmen der sekundären Wundheilung entsteht Fibrose, um die verbliebenen intakten Nephrone zu stabilisieren.

Das akute Nierenversagen als Risikofaktor für das CAANV

In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die akute Nierenschädigung selbst ein Risikofaktor für die Entstehung eines späteren chronischen Nierenversagens ist. In Untersuchungen zur Ischämiezeit zeigte sich, dass eine 20- bis 45-minütige Ischämie in gesunden Wildtyp-Tieren, aufgrund des geringen initialen Schadens, keine Auswirkungen auf die Langzeitergebnisse hat. Längere Ischämiezeiten von 90 bis 120 Minuten hingegen führten, durch eine stärkere akute Nierenschädigung, zu fibrotischen Schrumpfnieren [123]. Auch andere Studien konnten belegen, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des akuten Nierenschadens und der Ausbildung eines chronischen Nierenversagens gibt. *Chawla et al.* führten Langzeitstudien an Patienten mit akuter Niereninsuffizienz in den RIFLE Stadien R bis F durch. Sie konnten zeigen, dass bei Dialysepflicht eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit für die Progredienz zum chronischen Nierenversagen, als bei Patienten mit mildgradiger akuter Niereninsuffizienz, bestand [145]. In einer Studie an Patienten nach Herzoperationen, konnten *Ishani et al.* zeigen, dass das

Risiko für die Entwicklung eines chronischen Nierenversagens bzw. deren Progression, abhängig von der Höhe des postoperativen Kreatininanstiegs im Serum ist [146]. Somit bestimmt die Intensität des ANV das Ausmaß der chronischen Niereninsuffizienz.

In unseren Untersuchungen entwickelten die IRF4-knockout Mäuse nach 45-minütiger IRI eine chronische Niereninsuffizienz. Die Wildtyp-Tiere hingegen entwickelten bei gleichem operativen Vorgehen keine chronischen Schäden. Damit ist der immunmodulatorische Faktor IRF4 ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung des CAANV. Die modernen therapeutischen Verfahren entwickeln sich in Richtung individualisierte Therapie. So könnte mittels genetischem Screening das Fehlen von IRF4 ein potentieller Risikofaktor für die Chronifizierung einer akuten Nierenschädigung sein. Betroffene Patienten könnten nach akuter Nierenschädigung individualisiert betreut und engmaschig überwacht werden, um der Progression zu einer chronischen Nierenschädigung entgegenzuwirken. Präventivmedizinisch könnte hierbei eine individuell gezielte Einstellung des Blutdrucks, die nierenschonende salz- und eiweißarme Diät sowie die Vermeidung von nephrotoxischen Substanzen, empfohlen werden [147].

Perspektive

Diese Arbeit bestätigt die Relevanz alternativ-aktivierter Makrophagen für den Heilungsprozess nach akuter Nierenschädigung und unterstützt damit das Konzept von *Anders et al.*, dass chronische Entzündungen die eigentliche Ursache der chronischen Niereninsuffizienz sind. Chronischen Entzündungen werden durch das Versagen, die anfängliche akute Schadensreaktion zu lösen, aufrechterhalten. *Loss-of-function*-Mutationen des IRF4-Gens führen zu stärkeren Nierenschäden nach Ischämie-Reperfusion. Als Experimente der Grundlagenforschung, können die Ergebnisse dieser Dissertation nicht gleichwertig auf den Menschen übertragen werden. Man kann jedoch annehmen, dass das IRF4-Gen auch beim Menschen funktionelle Ähnlichkeiten aufweist. So bestätigten Humanstudien unserer Arbeitsgruppe, die im Anschluss an die Datenerhebung dieser Arbeit durchgeführt wurden, unsere Beobachtungen: An renalen Biopsien von Patientin mit hypertensiver Nephropathie zeigten sich erhöhte Level an M1-Makrophagen. Diese M1-Makrophagen-Prädominanz könnte ein weiterer Risikofaktor für die Ausbildung einer chronischen Nierenerkrankung sein. Somit könnte IRF4 auch beim Menschen als Regulator der Makrophagenpolarisierung wichtige Funktionen bei der Heilung nach postischämischer Nierenerkrankung haben. Die Dominanz von M1-Makrophagen bei IRF4^{-/-} Mäusen ging einher mit chronischen Entzündungen, dem Verlust von Tubuluszellen, Nierenfibrose und Vernarbung.

Um zu bestätigen, ob das Vorherrschen von M1-Makrophagen in der chronischen Phase nach IRI bei IRF4-Defizienz die Heilung verhindert, könnte man weitere Untersuchungen mit zellspezifischen Knockout-Tieren durchführen. Die weitere Forschungsfrage auf dem Gebiet der Makrophagenpolarisierung könnte des Weiteren neue therapeutische Möglichkeiten ergeben, die in Zukunft chronisch-entzündliche Krankheitsprozesse limitieren. Man kann annehmen, dass IRF4-/- Mäuse, da sie keine richtigen M2-Antworten entwickeln können, auch keine chronisch renale Entzündung auflösen können. Unsere Daten deuten weiter darauf hin, dass dies nicht nur durch eine intrinsische Veränderung der Makrophagenpolarisation erfolgt, sondern auch durch eine Veränderung des systemischen Zytokin-Milieus. Dieses wiederum hat sekundäre Auswirkungen auf den Phänotyp der Makrophagen. Auch hier sind weitere Studien erforderlich, um das komplexe Zusammenspiel von Zytokinen, Chemokinen und der Polarisation von Makrophagen zu entschlüsseln.

Da proinflammatorische Makrophagen hohe Mengen an membranständigem TNF- α exprimieren, könnte die therapeutische Blockade der biologischen Wirkung des immunmodulatorischen Signalstoffs die Entwicklung eines CAANV verhindern. In der Therapie des Morbus Crohn werden bereits anti-TNF- α Antikörper eingesetzt. Infliximab und Adalimumab sind hierbei in der Lage das von M1-Makrophagen exprimierte membranständige TNF- α zu binden und dieses durch Induktion von Apoptose zu eliminieren [148]. Möglicherweise könnte die gezielte Therapie mit einem der genannten Antikörper durch Apoptose der persistent-proentzündlichen M1-Makrophagen die Progredienz zum CAANV verhindern.

Die Hemmung der Entwicklung proinflammatorischen Makrophagen im akuten Entzündungsgeschehen nach renaler Ischämie könnte ein weiterer therapeutischer Angriffspunkt zur Vorbeugung eines CAANV sein. *Wilson et al.* zeigten im Modell der nephrotoxischen Nephritis in Ratten, dass die Suppression von NF- κ B, welches im Rahmen der TLR/IL-1R Signalübertragung eine Rolle spielt, die Entwicklung von M1-Makrophagen unterdrückt. Damit konnte das Ausmaß der chronischen Nierenschädigung vermindert werden. Dominant-negatives I κ B führte zur Inhibition von NF- κ B in *bone-marrow-derived macrophages* (BMDM). Nach Injektion dieser fluoreszenzmarkierten BMDMs in die Nierenarterie zeigte sich eine reduzierte Expression M1-Makrophagen-spezifischer Marker wie iNOS, IL-12, TNF- α und MHC-II. Im Gegensatz wurde IL-10, ein antiinflammatorischer M2-Makrophagen-typischer Marker, vermehrt exprimiert und führte zur Reduktion des chronischen Nierenschadens [149].

Auch die aktive Polarisierung der Makrophagen stellt eine mögliche therapeutische Option zur Reduktion der chronischen Niereninsuffizienz dar. *In vitro* und *in vivo* Studien von *Ranganathan*

et al. zeigten, dass *netrin-1*, das den Isotypen-switch vom proinflammatorischen M1-Makrophagen zu alternativ-aktivierten M2 provoziert, die Heilung nach renaler Ischämie-Reperfusion fördert [150].

Die Blockade M1-Makrophagen-spezifischer Liganden, wie TNF- α , die Hemmung der Entstehung proinflammatorischer Makrophagen oder die aktive Polarisierung von Makrophagen zum alternativ-aktivierten M2-Makrophagen Phänotyp, stellen mögliche therapeutische Angriffspunkte bei chronisch-entzündlichen Nierenerkrankungen dar. Wir konnten in der vorliegenden Dissertation zeigen, dass IRF4 ein mögliches therapeutisches Zielgen sein könnte. Die pharmakologische Deaktivierung proinflammatorischer Makrophagen mittels Induktion von IRF4 könnte eine weitere Behandlungsmöglichkeit des CAANVs darstellen.

Es besteht weiterhin großer Bedarf an der wissenschaftlichen Auseinandersetzung mit dem Gebiet der Makrophagenpolarisierung und der Rolle von IRF4. Nur so können neue Einblicke in die Pathogenese des CAANV gewonnen werden und Therapien entwickelt werden.

Limitationen dieser Arbeit

Die pathophysiologischen Erkenntnisse zur akuten Nierenschädigung und der Entstehung des chronisch-auf-akuten Nierenversagens stammen größtenteils aus Tierexperimenten. Es existieren verschiedene experimentelle Tiermodelle des CAANV. Aufgrund unserer Erfahrung und der einfachen Reproduzierbarkeit, haben wir das Model der einseitigen Ischämie-Reperfusion ausgewählt. Die gewonnenen Erkenntnisse sind Studien im Bereich der Grundlagenforschung und beziehen sich auf das Mausmodel. Die Übertragung der Resultate auf die Vorgänge im Menschen ist nur eingeschränkt möglich. Die gewonnenen Ergebnisse dienen als möglicher Ansatzpunkt für weitere Studien. Die menschliche Nierenphysiologie, der strukturelle Aufbau der Niere und das Immunsystem sind nicht identisch zu der in der Maus. Des Weiteren wird die Studie durch das Model selbst limitiert. An gesunden fünf Wochen alten Mäusen wurde durch eine abrupte und einmalige Unterbindung der Blutzufuhr zur Niere, eine akute hypoxische Nierenschädigung ausgelöst. Im klinischen Alltag hingegen bietet sich meist ein anderes Bild sodass unser Model die klinische Realität nicht exakt widerspiegelt. Vor allem ältere multimorbide Patienten erleiden ein akutes Nierenversagen. Häufig bedingen Komorbiditäten, wie arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus Typ II und andere Risikofaktoren, wie das Alter des Patienten, Medikamenteneinnahmen und Umweltfaktoren, Veränderungen der renalen Struktur, der Hämodynamik und der Wirkweise des Immunsystems. Ein weiterer Kritikpunkt an dem verwendeten Model ist, dass sich ein Nierenversagen im Menschen meist nicht unilateral präsentiert. Wir haben uns dennoch für das

Model der unilateralen Ischämie-Reperfusion entschieden, um zwischen der operierten ischämischen Niere und der nicht-operierten unverletzten Niere vergleichen zu können. Eine weitere Limitation dieser Studie liegt in der strukturierten vereinfachten Modellannahme, dass sich proinflammatorische M1-Makrophagen und profibrotische M2-Makrophagen streng unterscheiden lassen. Aufgrund multipler Umweltfaktoren und der hohen Plastizität von Makrophagen ist diese starre Einteilung nicht realistisch [103]. Die Pathophysiologie des CAANV ist im Menschen in Realität wahrscheinlich sehr viel komplexer. Um die Pathogenese weiter zu erforschen, wäre eine weitere wissenschaftliche Auseinandersetzung mit besser angepassten Modellen sinnvoll.

Kapitel 5

Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit untersucht die Auswirkungen der akuten Nierenschädigung (AKI) auf ein späteres chronisches Nierenversagen (CNV). Das CNV ist trotz deutlicher medizinischer Fortschritte noch immer eine schwerwiegende Erkrankung mit hoher Mortalität und Morbidität. Klinische Studien konnten belegen, dass es trotz scheinbarer Restitutio ad integrum, offenbar häufiger als vermutet zum irreversiblen Verlust von Nephronen und zur Entwicklung eines chronisch-auf-akutes-Nierenversagen (CAANV) kommt [43-46]. Grundsätzlich hat die Niere im Vergleich zu anderen Geweben, wie den Nerven oder dem Herzen ein enormes Regenerationspotential. Die totale Regeneration der Niere nach ANV ist jedoch anhand von funktionellen Parametern nur schwer nachzuweisen. Im klinischen Alltag ist der gängigste Funktionsparameter der Niere das Serumkreatinin. Es steigt jedoch erst ab einem Ausfall von mindestens der Hälfte der Nephrone an und kann damit keine suffiziente Aussage über die tatsächliche strukturelle und funktionelle Regeneration der Niere bieten [151]. Alter, Komorbiditäten, genetische Faktoren sowie die vorbestehende Niereninsuffizienz, gemessen am Ausgangsserumkreatinin, gelten als wichtige Risikofaktoren für die Verschlechterung und Chronifizierung der Nierenfunktion nach akuter Nierenschädigung [18, 44, 47, 48]. Wir sehen das ANV als weiteren unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung eines chronischen Nierenleidens und vermuten, dass der irreversible Nephronverlust bei ANV und das Immunsystem maßgeblich an der Entwicklung eines CAANV beteiligt sind [152]. Das langfristige therapeutische Ziel sollte es somit sein, durch Modulation der Immunantwort nach akuter Nierenschädigung, den Nephronverlust zu reduzieren bzw. die Nephronregeneration zu fördern. Großes forschendes Interesse liegt heute in der Entdeckung und Untersuchung von biochemischen Molekülen, die als Immunregulatoren des Immunsystems fungieren. Durch Mutation oder genetisch determinierten Unter- bzw. Überexpression werden diese Immunmodulatoren zum Risikofaktor für chronische Erkrankungen, wie dem CAANV. Interferon regulierender Faktor 4 (IRF4) ist, als genetischer Faktor, eines dieser koordinierenden Moleküle und modifiziert, als Regulator des CAANV, die Immunantwort. Die hier vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit dem Einfluss der durch Makrophagen vermittelten renalen Inflammation im Langzeitverlauf nach akuter ischämischer Nierenschädigung. Wir untersuchten die Rolle von IRF4 bei der Makrophagenphänotypisierung und deren Einfluss auf die Regenerationsprozesse der postischämischen Niere. Die aufgestellte Hypothese besagte, dass die durch IRF4-Defizienz vermehrt vorkommenden proentzündlichen Makrophagen durch die Vermittlung einer anhaltenden Inflammation zur Entwicklung eines

CAANV führen. Wir konnten zeigen, dass IRF4 nicht kontinuierlich exprimiert wird, sondern erst bei Aktivierung des Immunsystems im Rahmen von akuter Nierenverletzung induziert wird. Des Weiteren wird es zellspezifisch nur von myeloischen Zellen exprimiert. Weder die metabolische Aktivität, noch die Wundheilung, das Zellüberleben oder der Zelluntergang von nicht-myeloischen tubulären Epithelzellen wird von IRF4 beeinflusst.

Um die Auswirkungen von IRF4 auf das CNV in vivo zu untersuchen, haben wir ein Modell des CAANV entwickelt. Nach 45-minütiger ischämischer Nierenverletzung und einer Reperfusionszeit von fünf Wochen haben wir die Veränderungen und das Ausmaß der CNV untersucht. Die Expression von IRF4 nahm innerhalb von zehn Tagen nach IRI im Nierengewebe zu und blieb bis zu 5 Wochen nach IRI erhöht, was auf eine regulatorische Funktion in der chronischen Phase hindeutet. IRF4 defiziente-Mäuse zeigten vermehrte Nierenschädigung mit erhöhtem tubulären Zellverlust. Daneben kam es zu einem unzureichenden Isotypenwechsel von proinflammatorischen M1-Makrophagen zu antifibrotischen M2-Makrophagen. Dieses Phänomen ging mit einer erhöhten Expression von Markern der proinflammatorischen Makrophagen und einer reduzierten Expression von Markern der alternativ aktivierten Makrophagen einher. Folglich begrenzt IRF4 den chronischen Krankheitsverlauf und die Fibrosierung nach IRI, höchstwahrscheinlich durch die Polarisierung der proinflammatorischen M1-Makrophagen zu alternativ-aktivierten M2-Makrophagen und der damit verbundenen Begrenzung der Th1-primierten Zytokinreaktion. Bei IRF4-Defizienz kommt es, aufgrund der Reduktion der alternativ aktivierten Makrophagen-Subpopulation und der Prädominanz von proinflammatorischen M1-Makrophagen, in der chronischen Phase nach akuter Nierenschädigung zu andauernden intrarenalen Entzündungsreaktion. Dies bedingt den Verlust von tubulären Epithelzellen und die vermehrte Fibrosierung der Niere.

Aus den erhobenen Daten ergeben sich wesentliche Erkenntnisse über die Pathogenese des CAANV. Eine kontinuierliche Entzündungsreaktion nach akuter Nierenschädigung verhindert die vollständige Regeneration der Niere und führt zur Ausbildung eines CAANV. Die Beendigung der akuten Entzündungsreaktion nach hypoxischem Nierenschaden ist ein aktiver Prozess. Nach der ischämischen akuten Nierenschädigung benötigen Makrophagen IRF4, um eine dauerhafte M1-Makrophagen Polarisation zu vermeiden. IRF4 hat somit Einfluss auf die Wundheilung. Bei IRF4-Defizienz entsteht eine chronische Nierenschädigung mit dem Verlust tubulärer Epithelzellen, dem vermehrten Vorkommen atubulärer Glomeruli und einer verstärkten Bildung renale Fibrose. IRF4 ist einerseits ein genetischer Risikofaktor für die Entwicklung eines CAANV, andererseits bildet

IRF4 einen potenziellen therapeutischen Angriffspunkt, um die Entzündungsreaktion nach akuter Nierenverletzung oder Ischämie-Reperfusion bei Nierentransplantationen zu reduzieren. Immunmodulatoren, wie IRF4 und der Einfluss der Makrophagen-Phänotypen sollten weiter gezielt wissenschaftlich untersucht werden.

Kapitel 6

Literaturverzeichnis

6 Literaturverzeichnis

1. Van Biesen, W., R. Vanholder, and N. Lameire, *Defining acute renal failure: RIFLE and beyond*. Clin J Am Soc Nephrol, 2006. **1**(6): p. 1314-9.
2. Kellum, J.A., et al., *Developing a consensus classification system for acute renal failure*. Curr Opin Crit Care, 2002. **8**(6): p. 509-14.
3. Mehta, R.L., et al., *Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury*. Crit Care, 2007. **11**(2): p. R31.
4. Abuelo, J.G., *Normotensive ischemic acute renal failure*. N Engl J Med, 2007. **357**(8): p. 797-805.
5. American Society of N., *American Society of Nephrology Renal Research Report*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(7): p. 1886-903.
6. Lassnigg, A., et al., *Minimal changes of serum creatinine predict prognosis in patients after cardiothoracic surgery: a prospective cohort study*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(6): p. 1597-605.
7. Abdel-Kader, K. and P.M. Palevsky, *Acute kidney injury in the elderly*. Clin Geriatr Med, 2009. **25**(3): p. 331-58.
8. Van Biesen, W., et al., *Defining acute kidney injury: playing hide-and-seek with the unknown man?* Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(2): p. 399-401.
9. Mitarbeiter, H.G.u., *Innere Medizin*. 2009.
10. Bellomo, R., et al., *Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group*. Crit Care, 2004. **8**(4): p. R204-12.
11. Khwaja, A., *KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury*. Nephron Clin Pract, 2012. **120**(4): p. c179-84.
12. Kellum, J.A., *Acute kidney injury*. Crit Care Med, 2008. **36**(4 Suppl): p. S141-5.
13. Braunwald E, K.D., Hauser S, Longo D, et al., *Harrison's Principles of Internal Medicine: Acute renal failure*. 2008, 17: McGraw-Hill.
14. Silvester, W., R. Bellomo, and L. Cole, *Epidemiology, management, and outcome of severe acute renal failure of critical illness in Australia*. Crit Care Med, 2001. **29**(10): p. 1910-5.
15. Waikar, S.S., et al., *Declining mortality in patients with acute renal failure, 1988 to 2002*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(4): p. 1143-50.
16. USRDS, *Hospitalizations for acute kidney injury, with or without dialysis*,. 2009: A.D.R. 2009, USRDS.
17. Ali, T., et al., *Incidence and outcomes in acute kidney injury: a comprehensive population-based study*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(4): p. 1292-8.
18. Uchino, S., et al., *Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study*. JAMA, 2005. **294**(7): p. 813-8.
19. Chertow, G.M., et al., *Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(11): p. 3365-70.
20. Perinel, S., et al., *Transient and Persistent Acute Kidney Injury and the Risk of Hospital Mortality in Critically Ill Patients: Results of a Multicenter Cohort Study*. Crit Care Med, 2015.
21. Xue, J., et al., *Acute kidney injury influences mortality in lung transplantation*. Ren Fail, 2014. **36**(4): p. 541-5.
22. Khatri, M., et al., *Acute kidney injury is associated with increased hospital mortality after stroke*. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2014. **23**(1): p. 25-30.
23. Lopes, J.A., et al., *Long-term risk of mortality for acute kidney injury in HIV-infected patients: a cohort analysis*. BMC Nephrol, 2013. **14**: p. 32.
24. Mehta, R.L., et al., *Nephrology consultation in acute renal failure: does timing matter?* Am J Med, 2002. **113**(6): p. 456-61.
25. Grams, M.E., et al., *A Meta-analysis of the Association of Estimated GFR, Albuminuria, Age, Race, and Sex With Acute Kidney Injury*. Am J Kidney Dis, 2015.
26. Wonnacott, A., et al., *Epidemiology and outcomes in community-acquired versus hospital-acquired AKI*. Clin J Am Soc Nephrol, 2014. **9**(6): p. 1007-14.

27. Hoste, E.A., et al., *Epidemiology of acute kidney injury*. Contrib Nephrol, 2010. **165**: p. 1-8.
28. Deetjen, E.-J.S., J. Hescheler, *Physiologie 4. Auflage*. Elsevier Urban & Fischer, 2005: p. 521ff.
29. Mulay, S.R., A. Linkermann, and H.J. Anders, *Necroinflammation in Kidney Disease*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(1): p. 27-39.
30. Evans, R.G., et al., *Intrarenal oxygenation: unique challenges and the biophysical basis of homeostasis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(5): p. F1259-70.
31. Le Dorze, M., et al., *The role of the microcirculation in acute kidney injury*. Curr Opin Crit Care, 2009. **15**(6): p. 503-8.
32. Devarajan, P., *Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(6): p. 1503-20.
33. Thadhani, R., M. Pascual, and J.V. Bonventre, *Acute renal failure*. N Engl J Med, 1996. **334**(22): p. 1448-60.
34. U., W., *Lehrbuch Histologie*. Urban & Fischer. 2006. 2: 34-35.
35. Kumar V, A.A., Fausto N, Mitchell R, *Robbins Basic Pathology*. SAUNDERS Elsevier, 2007: p. 8: 564-566.
36. Schrier, R.W., et al., *Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy*. J Clin Invest, 2004. **114**(1): p. 5-14.
37. Wangsiripaisan, A., et al., *Role of polymeric Tamm-Horsfall protein in cast formation: oligosaccharide and tubular fluid ions*. Kidney Int, 2001. **59**(3): p. 932-40.
38. Jennings, P., et al., *Membrane targeting and secretion of mutant uromodulin in familial juvenile hyperuricemic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(1): p. 264-73.
39. Sheridan, A.M. and J.V. Bonventre, *Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2000. **9**(4): p. 427-34.
40. Andrassy, K.M., *Comments on 'KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease'*. Kidney Int, 2013. **84**(3): p. 622-3.
41. Goncalves, G.M., et al., *New roles for innate immune response in acute and chronic kidney injuries*. Scand J Immunol, 2011. **73**(5): p. 428-35.
42. 16. Deutsche Gesellschaft für Nephrologie, 29.07.2015. In <http://www.dgfn.eu/presse/downloadbereich>
43. Briggs, J.D., et al., *Renal function after acute tubular necrosis*. Br Med J, 1967. **3**(5564): p. 513-6.
44. Bagshaw, S.M., *Short- and long-term survival after acute kidney injury*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(7): p. 2126-8.
45. Lo, L.J., et al., *Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease*. Kidney Int, 2009. **76**(8): p. 893-9.
46. Amdur, R.L., et al., *Outcomes following diagnosis of acute renal failure in U.S. veterans: focus on acute tubular necrosis*. Kidney Int, 2009. **76**(10): p. 1089-97.
47. Bagshaw, S.M., et al., *Early acute kidney injury and sepsis: a multicentre evaluation*. Crit Care, 2008. **12**(2): p. R47.
48. Fliser, D., E. Ritz, and E. Franek, *Renal reserve in the elderly*. Semin Nephrol, 1995. **15**(5): p. 463-7.
49. Hackbarth, H. and D.E. Harrison, *Changes with age in renal function and morphology in C57BL/6, CBA/HT6, and B6CBAF1 mice*. J Gerontol, 1982. **37**(5): p. 540-7.
50. Bonventre, J.V. and A. Zuk, *Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease?* Kidney Int, 2004. **66**(2): p. 480-5.
51. Yang, L., B.D. Humphreys, and J.V. Bonventre, *Pathophysiology of acute kidney injury to chronic kidney disease: maladaptive repair*. Contrib Nephrol, 2011. **174**: p. 149-55.
52. Fett, N., *Scleroderma: nomenclature, etiology, pathogenesis, prognosis, and treatments: facts and controversies*. Clin Dermatol, 2013. **31**(4): p. 432-7.
53. Lech, M., et al., *Tlr8/Sigirr prevents murine lupus by suppressing the immunostimulatory effects of lupus autoantigens*. J Exp Med, 2008. **205**(8): p. 1879-88.
54. Kindt, T.J., et al., *Kuby immunology*. 6th ed. 2007, New York: W.H. Freeman. xxii, 574, A-31, G-12, AN-27, I-27 p.
55. Janeway A, T.P., Walport M, Shlomchik M, *Immunologie*. 2005, 5: SPEKTRUM akademischer Verlag.

56. Lucas, M., et al., *Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15*. Immunity, 2007. **26**(4): p. 503-17.
57. Lin, Q., et al., *The essential roles of Toll-like receptor signaling pathways in sterile inflammatory diseases*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(10): p. 1422-32.
58. Löffler, G.a.P.P., *Biochemie & Pathobiochemie*. Vol. 7. Auflage. ed2003: Springer Verlag.
59. Akira, S., *Pathogen recognition by innate immunity and its signaling*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2009. **85**(4): p. 143-56.
60. Hume, D.A., *The mononuclear phagocyte system*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(1): p. 49-53.
61. Maltzman, J.S. and V.H. Haase, *Low oxygen stimulates the immune system*. Kidney Int, 2008. **73**(7): p. 797-9.
62. Amura, C.R., et al., *Complement activation and toll-like receptor-2 signaling contribute to cytokine production after renal ischemia/reperfusion*. Mol Immunol, 2012. **52**(3-4): p. 249-57.
63. Kawai, T. and S. Akira, *The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition*. Int Immunol, 2009. **21**(4): p. 317-37.
64. Creagh, E.M., *TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity*. Trends Immunol, 2006. **27**(8).
65. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
66. Wolfs, T.G., et al., *In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1286-93.
67. Kindt, T.J., et al., *Kuby immunology*. 6th ed. 2007, New York: W.H. Freeman. 2007.
68. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Pathogen recognition by the innate immune system*. Int Rev Immunol, 2011. **30**(1): p. 16-34.
69. Takaoka, A., T. Tamura, and T. Taniguchi, *Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis*. Cancer Sci, 2008. **99**(3): p. 467-78.
70. Honda, K., A. Takaoka, and T. Taniguchi, *Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 349-60.
71. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. Science, 1994. **264**(5164): p. 1415-21.
72. Tamura, T., et al., *The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 535-84.
73. Au, W.C., et al., *Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11657-61.
74. Paun, A. and P.M. Pitha, *The IRF family, revisited*. Biochimie, 2007. **89**(6-7): p. 744-53.
75. Honda, K. and T. Taniguchi, *IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(9): p. 644-58.
76. Wang, Y., et al., *IRF-1 promotes inflammation early after ischemic acute kidney injury*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(7): p. 1544-55.
77. Negishi, H., et al., *Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 15989-94.
78. Shaffer, A.L., et al., *IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy?* Clin Cancer Res, 2009. **15**(9): p. 2954-61.
79. Watanabe, T., et al., *Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 545-59.
80. Honma, K., et al., *Interferon regulatory factor 4 negatively regulates the production of proinflammatory cytokines by macrophages in response to LPS*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 16001-6.
81. Hu, C.M., et al., *Modulation of T cell cytokine production by interferon regulatory factor-4*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49238-46.
82. Lee, C.G., et al., *A distal cis-regulatory element, CNS-9, controls NFAT1 and IRF4-mediated IL-10 gene activation in T helper cells*. Mol Immunol, 2009. **46**(4): p. 613-21.

83. Satoh, T., et al., *The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 936-44.
84. MacFarlane, M., *TRAIL-induced signalling and apoptosis*. Toxicol Lett, 2003. **139**(2-3): p. 89-97.
85. Degli-Esposti, M.A., et al., *The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 813-20.
86. Gualco, G., L.M. Weiss, and C.E. Bacchi, *MUM1/IRF4: A Review*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2010. **18**(4): p. 301-10.
87. Zheng, Y., et al., *Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses*. Nature, 2009. **458**(7236): p. 351-6.
88. Brustle, A., et al., *The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 958-66.
89. Tamura, T., et al., *IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2573-81.
90. Lu, R., et al., *IRF-4,8 orchestrate the pre-B-to-B transition in lymphocyte development*. Genes Dev, 2003. **17**(14): p. 1703-8.
91. Klein, U., et al., *Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination*. Nat Immunol, 2006. **7**(7): p. 773-82.
92. Jang, H.R., et al., *The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney*. J Mol Med (Berl), 2009. **87**(9): p. 859-64.
93. Kinsey, G.R., et al., *Regulatory T cells suppress innate immunity in kidney ischemia-reperfusion injury*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(8): p. 1744-53.
94. Liu, M., et al., *Effect of T cells on vascular permeability in early ischemic acute kidney injury in mice*. Microvasc Res, 2009. **77**(3): p. 340-7.
95. Burne, M.J., et al., *Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure*. J Clin Invest, 2001. **108**(9): p. 1283-90.
96. Thurman, J.M., et al., *C3a is required for the production of CXC chemokines by tubular epithelial cells after renal ischemia/reperfusion*. J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1819-28.
97. Thurman, J.M., et al., *Acute tubular necrosis is characterized by activation of the alternative pathway of complement*. Kidney Int, 2005. **67**(2): p. 524-30.
98. Ichimura, T., et al., *Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells*. J Clin Invest, 2008. **118**(5): p. 1657-68.
99. Li, L. and M.D. Okusa, *Macrophages, dendritic cells, and kidney ischemia-reperfusion injury*. Semin Nephrol, 2010. **30**(3): p. 268-77.
100. Kono, H. and K.L. Rock, *How dying cells alert the immune system to danger*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 279-89.
101. Dong, X., et al., *Antigen presentation by dendritic cells in renal lymph nodes is linked to systemic and local injury to the kidney*. Kidney Int, 2005. **68**(3): p. 1096-108.
102. Wang, N., H. Liang, and K. Zen, *Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 614.
103. Anders, H.J. and M. Ryu, *Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis*. Kidney Int, 2011. **80**(9): p. 915-25.
104. Alberto Mantovani^{1, *}, Antonio Sica², Silvano Sozzani^{2,3}, Paola Allavena^{2,, et al.}, *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. 2004.
105. Lee, S., et al., *Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(2): p. 317-26.
106. Lech, M. and H.J. Anders, *Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(7): p. 989-97.
107. Allam, R., et al., *Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(8): p. 1375-88.
108. Wang, Y., et al., *Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease*. Kidney Int, 2007. **72**(3): p. 290-9.
109. Day, Y.J., et al., *Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue*

- protection: role of macrophages. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005. **288**(4): p. F722-31.
110. Jo, S.K., et al., *Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats*. *Nephrol Dial Transplant*, 2006. **21**(5): p. 1231-9.
 111. Jang, H.S., et al., *Infiltrated macrophages contribute to recovery after ischemic injury but not to ischemic preconditioning in kidneys*. *Transplantation*, 2008. **85**(3): p. 447-55.
 112. Lassen, S., et al., *Ischemia reperfusion induces IFN regulatory factor 4 in renal dendritic cells, which suppresses postischemic inflammation and prevents acute renal failure*. *J Immunol*, 2010. **185**(3): p. 1976-83.
 113. Lassen, S.L., *Die Funktion des Interferon-regulierenden Faktors 4 in intrarenalen Antigen-präsentierenden Zellen beim akuten Nierenversagen*. . 2012. LMU München, Dissertation, Medizinische Fakultät.
 114. Mittrucker, H.W., et al., *Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function*. *Science*, 1997. **275**(5299): p. 540-3.
 115. Van Rooijen, N. and A. Sanders, *Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications*. *J Immunol Methods*, 1994. **174**(1-2): p. 83-93.
 116. Dong, X., et al., *Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury*. *Kidney Int*, 2007. **71**(7): p. 619-28.
 117. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. *Clin Chem*, 2009. **55**(4): p. 611-22.
 118. Miltenyi Biotec GmbH. p., http://www.miltenyibiotec.com/download/flyer_en/680/MACS_Technology_Flyer.pdf.
 119. Roche, O., *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)*. **Content version: February 2011**.
 120. Wu, H., et al., *TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(10): p. 2847-59.
 121. Gunthner, R., et al., *Pattern-recognition receptor signaling regulator mRNA expression in humans and mice, and in transient inflammation or progressive fibrosis*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(9): p. 18124-47.
 122. Guo, S., et al., *IRF4 is a novel mediator for neuronal survival in ischaemic stroke*. *Cell Death Differ*, 2014. **21**(6): p. 888-903.
 123. Lech, M., et al., *Macrophage phenotype controls long-term AKI outcomes--kidney regeneration versus atrophy*. *J Am Soc Nephrol*, 2014. **25**(2): p. 292-304.
 124. Wynn, T.A. and K.M. Vannella, *Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis*. *Immunity*, 2016. **44**(3): p. 450-462.
 125. Lech, M., et al., *IRF4 deficiency abrogates lupus nephritis despite enhancing systemic cytokine production*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(8): p. 1443-52.
 126. Ko, G.J., et al., *Macrophages contribute to the development of renal fibrosis following ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury*. *Nephrol Dial Transplant*, 2008. **23**(3): p. 842-52.
 127. Basile, D.P., et al., *Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. **281**(5): p. F887-99.
 128. Mudter, J., et al., *IRF4 selectively controls cytokine gene expression in chronic intestinal inflammation*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2009. **57**(5): p. 369-76.
 129. Bravo Garcia-Morato, M., et al., *New human combined immunodeficiency caused by interferon regulatory factor 4 (IRF4) deficiency inherited by uniparental isodisomy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2018. **141**(5): p. 1924-1927 e18.
 130. Lech, M., et al., *Resident dendritic cells prevent postischemic acute renal failure by help of single Ig IL-1 receptor-related protein*. *J Immunol*, 2009. **183**(6): p. 4109-18.
 131. Skuginna, V., et al., *Toll-like receptor signaling and SIGIRR in renal fibrosis upon unilateral ureteral obstruction*. *PLoS One*, 2011. **6**(4): p. e19204.
 132. Wermuth, P.J. and S.A. Jimenez, *The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases*. *Clin Transl Med*, 2015. **4**: p. 2.
 133. Stramer, B.M., R. Mori, and P. Martin, *The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair*. *J Invest Dermatol*, 2007. **127**(5): p. 1009-17.
 134. Sindrilaru, A., et al., *An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron*

- impairs wound healing in humans and mice.* J Clin Invest, 2011. **121**(3): p. 985-97.
135. Cretney, E., et al., *The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells.* Nat Immunol, 2011. **12**(4): p. 304-11.
 136. Kishi, Y., et al., *Protein C receptor (PROCR) is a negative regulator of Th17 pathogenicity.* J Exp Med, 2016. **213**(11): p. 2489-2501.
 137. Chen, Q., et al., *IRF-4-binding protein inhibits interleukin-17 and interleukin-21 production by controlling the activity of IRF-4 transcription factor.* Immunity, 2008. **29**(6): p. 899-911.
 138. Rengarajan, J., et al., *Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression.* J Exp Med, 2002. **195**(8): p. 1003-12.
 139. Huber, M., et al., *IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 20846-51.
 140. Lee, S.B. and R. Kalluri, *Mechanistic connection between inflammation and fibrosis.* Kidney Int Suppl, 2010(119): p. S22-6.
 141. Boor, P., T. Ostendorf, and J. Floege, *Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets.* Nat Rev Nephrol, 2010. **6**(11): p. 643-56.
 142. Nishida, M. and K. Hamaoka, *Macrophage phenotype and renal fibrosis in obstructive nephropathy.* Nephron Exp Nephrol, 2008. **110**(1): p. e31-6.
 143. Humphreys, B.D., et al., *Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury.* Cell Stem Cell, 2008. **2**(3): p. 284-91.
 144. Yang, L., et al., *Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury.* Nat Med, 2010. **16**(5): p. 535-43, 1p following 143.
 145. Chawla, L.S., et al., *The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease.* Kidney Int, 2011. **79**(12): p. 1361-9.
 146. Ishani, A., et al., *The magnitude of acute serum creatinine increase after cardiac surgery and the risk of chronic kidney disease, progression of kidney disease, and death.* Arch Intern Med, 2011. **171**(3): p. 226-33.
 147. Chawla, L.S., *Acute kidney injury leading to chronic kidney disease and long-term outcomes of acute kidney injury: the best opportunity to mitigate acute kidney injury?* Contrib Nephrol, 2011. **174**: p. 182-190.
 148. Shen, C., et al., *Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept.* Aliment Pharmacol Ther, 2005. **21**(3): p. 251-8.
 149. Wilson, H.M., et al., *Inhibition of macrophage nuclear factor-kappaB leads to a dominant anti-inflammatory phenotype that attenuates glomerular inflammation in vivo.* Am J Pathol, 2005. **167**(1): p. 27-37.
 150. Ranganathan, P.V., C. Jayakumar, and G. Ramesh, *Netrin-1-treated macrophages protect the kidney against ischemia-reperfusion injury and suppress inflammation by inducing M2 polarization.* Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **304**(7): p. F948-57.
 151. Ibrahim, H.N., et al., *Long-term consequences of kidney donation.* N Engl J Med, 2009. **360**(5): p. 459-69.
 152. Hsu, C.Y., *Yes, AKI truly leads to CKD.* J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(6): p. 967-9.

7 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| ADQI | acute dialysis quality initiative |
| AKI | acute kidney injury |
| AKIN | acute kidney injury network |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ARF | acute renal failure |
| ANV | Akutes Nierenversagen |
| Arg 1 | Arginase 1 |
| ATN | Akute Tubulusnekrose |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BMDMs | bone marrow derived macrophages |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| Bspw. | beispielsweise |
| CAANV | Chronisch-auf-akutes-Nierenversagen |
| CCL 2 | CC-Motiv-Chemokin-Ligand 2 |
| CD | cluster of differentiation |
| cDNA | complementary-Desoxyribonukleinsäure |
| CNI | Chronische Niereninsuffizienz |
| CNV | Chronisches Nierenversagen |
| CTGF | connective tissue growth factor |
| CXCL10 | C-X-C motif chemokine 10 |
| DAMP | damage associated molecular pattern |
| DD | death domain |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ECL | enhanced chemiluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | enzyme linked immunosorbent assay |
| ESRD | end stage renal disease |
| FACS | fluorescence-activated cell sorting |
| FSP 1 | fibroblast-specific protein 1 |
| g | Gramm |
| GFR | Glomeruläre Filtrationsrate |
| h | Stunde (hour) |
| HIV | Humane Immundefizienz-Virus |
| IAD | interferon regulatory factor-Assoziationsdomäne |
| IKK | inhibitor of NF-kappa-B |
| IL | Interleukin |
| IL-1R | Interleukin 1 receptor |
| INF | Interferon |

| | |
|----------------|--|
| iNOS | inducible nitric oxide synthase |
| IR | Ischämie-Reperfusion |
| IRAK | Interleukin-1 receptor associated kinase |
| IRF | interferon regulatory factor |
| IRI | ischemia reperfusion injury |
| ISRE | Interferon-stimulated response elements |
| KDIGO | kidney disease: improving global outcomes |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| KO | Kontralaterale Niere |
| LDH | Laktat-Dehydrogenase |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| m | Meter |
| M | Stoffmengenkonzentration in Mol / Liter |
| MACS | magnetic activated cell sorting |
| MAPKs | mitogen-activated protein kinases |
| MHC | major histocompatibility complex |
| mRNA | Messenger RNA |
| MR | mannose receptor |
| MyD88 | myeloid differentiation factor 88 |
| NF- κ B | nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| NGAL | neutrophil gelatinase-associated lipocalin |
| NLR | nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors |
| NOD | nucleotide-binding oligomerization domain |
| PAMP | pathogen associated molecular patterns |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| pDC | Plasmazytoide dendritische Zellen |
| PGE 1 | Prostaglandin E1 |
| PRR | pattern recognition receptors |
| PS | Penicillin-Streptomycin |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | reactive oxygen species |
| RLH | retinoic-acid-inducible protein-like helicases |
| RT-PCR | real time PCR |
| SEM | Standard error of the mean |
| SIGIRR | single Ig IL-1 receptor-related protein |
| sog. | sogenannt |
| TEC | tubular epithelcells |
| TGF β | transforming growth factor beta |
| TIR | Toll-interleukin-1-receptor |
| TLR | Toll like receptor |
| TNF- α | tumor necrosis factor alpha |

| | |
|--------|--|
| TRAF 6 | tumor necrosis factor receptor associated factor 6 |
| TRAM | TRIF-related adaptor molecule |
| TRIF | TIR-domain containing adaptor protein-inducing IFN-gamma |
| U | Einheit (unit) |
| v. a. | Vor allem |
| WT | Wildtyp |

8 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. hum. biol. Maciej Lech für seine Führung und Bereitschaft zur ständigen sachlichen Diskussion auf Augenhöhe bedanken. Als fachlich äußerst kompetenter und hilfreicher Mentor hat er mich bei meiner experimentellen Arbeit jederzeit unterstützt. Durch ihn habe ich Einblicke in die Tätigkeit des wissenschaftlichen Arbeitens bekommen. Ich bedanke mich für eine Freundschaft, die sich in meiner Zeit im Forschungslabor entwickeln konnte und weiter anhält. Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders für die Organisation und die Aufnahme in sein Forschungslabor bedanken. Er hat es mir ermöglicht selbstständig Experimente in seinem Forschungslabor durchzuführen und mich stets mit wertvollen Hinweisen und Vorschlägen unterstützt und motiviert. Daneben bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Endres für die Aufnahme in das Förderprogramm Graduiertenkolleg 1202 „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft und für die damit verbundene fachliche und die finanzielle Unterstützung. Für die methodische Unterstützung bei der Erstellung der hier vorliegenden Arbeit bedanke ich mich bei Herrn Dan Draganovici und Frau Janina Mandelbaum. Ein weiterer Dank gilt Frau Heni Eka Susanti für die technische Unterstützung in der Laborarbeit, die Motivation und die entstandene Freundschaft. Ich möchte mich auch bei allen nicht namentlich genannten für diese einzigartige Zeit bedanken. Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Dabei ganz besonders bei meinen Eltern und meiner Schwester. Für die schöne und lehrreiche habe die Zeit im Labor bedanke ich mich.
